ZUR QUARTÄRSTRUKTUR UND SAUERSTOFFBINDUNG BEIM HÄMOCYANIN AUS DER VOGELSPINNE EURYPELMA CALIFORNICUM

Heinz Decker

1981

ZUR QUARTÄRSTRUKTUR UND SAUERSTOFFBINDUNG BEIM HÄMOCYANIN AUS DER VOGELSPINNE EURYPELMA CALIFORNICUM

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät der Biologie
der
Ludwig - Maximilians - Universität
München

vorgelegt von Heinz Decker
aus Regensburg

August 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernt Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfhard Bandlow
Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.1981

MEINER MUTTER

Danksagung:

Die vorliegende Arbeit wurde am zoologischen Institut der Ludwig - Maximilian - Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen für sein stetes Interesse, seine Hilfsbereitschaft, sehr wertvollen Anregungen und ständig geduldige Bereitschaft zu Diskussionen.

Eine wesentliche Bereicherung erhielt meine Arbeit durch den einwöchigen Arbeitsaufenthalt im Labor von Prof. Dr. E. van Bruggen (Holland).

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Jürgen Markl für seine faire, enge und angenehme Zusammenarbeit, die offenen konstruktiven Diskussionen und sonstigen hilfreichen und freundschaftlichen Ratschläge.

Ferner danke ich allen Kollegen, insbesondere Herrn Dr. Werner Strych, für die immer wieder erfreulich angenehme Zusammenarbeit.

Frau Maria Brenzinger war mir eine wertvolle Hilfe bei der Herstellung der Zeichnungen und Fotographien. Besonders herzlich danke ich auch meiner Schwester Monika für ihre Hilfe bei der Bewältigung der Schreibarbeiten.

INHALTSVERZEICHNIS

A EINLEITUNG....1

B MATERIAL UND METHODEN....5

1. Chemikalien....5

2. Tiere, Tierhaltung und Hämolymphegewinnung....6

3. Methoden....6
3. 1. Proteinbestimmung und UV Spektren....6
3. 2. Isolierung des 37 S-Hämocyanins und der Untereinheiten....6
3. 3. Pufferspezies....7
3. 4. Dialysen....7
3. 5. Konzentrierungsmethoden....7
3. 6. Elektrophoresen....7
a) Analytische Plattengelelektrophorese.(PAGE)....7
b) Analytische SDS-Acrylamidplattengelelektrophorese (SDS-PAGE)....8
c) Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese....8
d) Mikropräparative Plattengelelektrophorese....8
e) Zweidimensionale Immunelektrophorese....8
f) Anfärbung und Auswerten der Gele....9
3. 7. Gelchromatographische Methoden....9
a) Säulengelchromatographie....9
b) Dünnschichtgelchromatographie (DGC)....9
3. 8. Analytische Ultrazentrifugation....10
3. 9. Elektronenmikroskopie....10
3.10. Sauerstoffbindungskurven....11
3.11. Enzymatische Spaltung von nativen Polypeptidketten und am nativen 37 S-Hämocyanin....11
3.12. Quervernetzung des 37 S-Hämocyanins mit bifunktionellen Imidaten....12
3.13. Nomenklatur und Abkürzungen....14

C. ERGEBNISSE....15

1. Einfluß verschiedener Parameter auf das Reassoziationsverhalten....15

2. Bedeutung des auftretenden Hexamers bei der Reassoziation....21

3. Homogenität und Untereinheitenzusammensetzung des 37 S-Hämocyanins....26

4. Reassoziation einzelner Untereinheiten....27
4. 1. Vorversuche....27
a) Allgemeines....27
b) Zur Dünnschichtgelchromatographie....31
c) Zur analytischen Ultrazentrifugation....31
d) Zur Elektronenmikroskopie....32
e) Zur analytischen Plattengelelektrophorese....33
f) Zur zweidimensionalen Immunelektrophorese....33
4. 2. Hauptversuche....34
4. 3. Einfluß der isolierten Komponenten b und c des Heterodimers bc auf die Reassoziation....45
4. 4. Regeln zur Reassoziation....47

5. Isolierung und Charakterisierung von Reassoziationsprodukten....52
5. 1. Berechnung der Untereinheitenzusammensetzung von isolierten Reassoziationsprodukten....52
5. 2. Versuchsdurchführung....52
5. 3. Ergebnisse....55

6. Qualitativer Vergleich von Reassoziation und Dissoziation in der Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) und im Elektronenmikroskop....63
6. 1. Die Beschreibung des Gelmusters nach Andissoziieren des 37-S-Hämocyanins....63
6. 2. Beschreibung des Gelmusters nach der Reassoziation aus einem Untereinheitengemisch....65
6. 3. Vergleich von Reassoziations- und Dissoziatons-produkten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen....67

7. Bruchstücke des 37 S-Hämocyanins nach Quervernetzung mit bifunktionellen Imidaten....69
7. 1. Vorversuche: Einfluß von Pufferspezies, Temperatur und Konzentration auf die " Vernetzungs- " Reaktion..70
7. 2. Vergleich des elektrophoretischen Banden-Musters nach Quervernetzung....73
7. 3. Bestimmung der Anzahl der Untereinheiten von einzelnen quervernetzten Aggregaten....77

8. Limitierte Proteolyse des 37 S-Hämocyanins....79
8. 1. Analytische Untersuchungen....79
8. 2. Versuche zur Trennung der durch limitierte Proteolyse gebildeten Spaltprodukte und deren Charakterisierung....81

9. Zur Funktion des Hämocyanins....86
9. 1. Das Hill-Diagramm....86
9. 2. Fehlerbetrachtung....88

10. Funktionelle Charakterisierung der isolierten Untereinheiten von Eurypelma californicum....90
10. 1. Abhängigkeit vom pH....90
10. 2. Temperaturabhängigkeit....91
10. 3. Abhängigkeit von der Pufferspezies....93
10. 4. Alterung der Untereinheiten....93

11. Funktionelle Charakterisierung der isolierten Untereinheiten von Cupiennius salei....95

12. Funktionelle Untersuchung der Hämolymphen einzelner Individuen....97

13. Funktionelle Charakterisierung des 37 S-Hämocyanins.101
13. 1. Einfluß des pH....101
13. 2. Einfluß der Temperatur....107
13. 3. Einfluß von Chloridionen....118
13. 4. Einfluß verschiedener Metaboliten....119

14. Der Einfluß der limitierten Proteolyse auf die Sauerstoffbindung....122
14. 1. Einfluß auf die einzelnen Untereinheiten....122
14. 2. Einfluß auf das 37 S-Hämocyanin....125

15. Funktionelle Charakterisierung von Reassoziationsprodukten....127
16. Fixierung des 37 S-Hämocyanins im T-Konformationszustand....135

D. DISKUSSION....141

1. Zur funktionellen Rolle der Untereinheiten....141
2. Zur strukturellen Bedeutung der Untereinheiten....144
2. 1. Die Abhängigkeit der Reassoziation von verschiedenen Parametern....144
2. 2. Die Bedeutung des reassoziierten Hexamers....148
2. 3. Die Notwendigkeit von heterogenen Untereinheiten....150
2. 4. Vorschlag eines Modells des 37 S-Hämocyanins von Eurypelma californicum....153
2. 5. Heterologe - isologe Assoziation....156
2. 6. Hypothetischer Assoziationsweg....157
2. 7. Zur Dissoziation....158
3. Zur Funktion des Hämocyanins....160
3. 1. Einfluß pH, Ca^{2+}, Mg^{2+} und Cl^-....161
3. 2. Einfluß der Temperatur....162
3. 3. Thermodynamische Überlegungen....164
3. 4. Die allosterische Einheit....166
3. 5. Einfluß der fortschreitenden Oxygenierung auf die allosterischen Eigenschaften....170
3. 6. Struktur - Funktionsbeziehungen bei Hämocyaninen....178

E. ZUSAMMENFASSUNG....182

F. LITERATUR....187

G. ANHÄNGE....194

1. Flächenberechnung....194
2. Auswertung der Sauerstoffbindungskurven....196

A. EINLEITUNG

Den meisten hochmolekularen Proteinen ist gemeinsam, daß sie aus mehreren Polypeptidketten bestehen, die miteinander meist durch nichtkovalente Bindungen verknüpft sind. Dieses Bauprinzip bezeichnet man als Quartärstruktur. Unter bestimmten, meist unphysiologischen Bedingungen zerfällt ein solcher Molekülverband in die einzelnen Untereinheiten. Ihre Anzahl schwankt meist zwischen 2-12; ihr Molekulargewicht übersteigt selten einen Wert von ca. 100 000 (Klotz et al., 1975). Jede Polypeptidkette stellt in der Regel auch die kleinste funktionelle Einheit dar.
Durch die Assoziation der Untereinheiten gewinnen die entstehenden Oligomere neue Eigenschaften hinzu, welche die einzelnen Polypeptide, isoliert betrachtet, nicht besitzen, die Modulierbarkeit durch Effektoren und den kooperativen Effekt. Die Untereinheiten beeinflussen sich wechselseitig in der Weise, daß die Aktivität gesteigert oder gesenkt wird und jedenfalls nicht der Summe der Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten entspricht. Dieser Effekt kommt in einer sigmoiden Aktivitätskurve gegenüber einer sonst hyperbolischen zum Ausdruck.
Bei vielen Proteinen konnte nachgewiesen werden, daß die Untereinheiten unterschiedlich sind. Bekannte Beispiele sind hierfür Aspartat - Transcarbamylase und Hämoglobin, während z.B. Aldolase und Glyceraldehyd — 3 — Phosphat-Dehydrogenase aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut sind. Dabei scheint die Kooperativität nicht mit der Heterogenität der Untereinheiten verknüpft zu sein: bei Glyceraldehyl — 3 — Phosphat - Dehydrogenase ist sie vorhanden, bei der Aldolase fehlt sie dagegen.
Frei gelöste respiratorische Pigmente sind gute Beispiele für eine hochkomplexe Quartärstruktur. Als Riesenmoleküle mit 450 000 - 8 000 000 Dalton stehen die Hämocyanine bezüglich ihrer Größe zwischen den meisten bekannten und gut

untersuchten Proteinen, wie z.B. Hämoglobin (M_r = 64 500) oder Glutaminsynthetase aus Escherichia coli (M_r = 592 000), und den Viren wie z.B. dem Poliomyelitis-Virus ($M_r = 5{,}5 \cdot 10^6$). Hämocyanine sind die kupferhaltigen Atmungsproteine bei sehr vielen Arten der Mollusca und Arthropoda. Sie liegen extrazellulär in einer Konzentration von 0,3 - 100 mg/ml in der Hämolymphe vor und sind für deren blaue Farbe verantwortlich. Hämocyanine binden pro zwei Kupferatome ein Molekül Sauerstoff.

Hinsichtlich ihrer Architektur und ihrer Polypeptidketten unterscheiden sich die Hämocyanine der Molluscen und der Arthropoden grundlegend. Beim Cephalopodenhämocyanin treten 10 Untereinheiten mit je einem Molekulargewicht von 400 000 zu einem zylindrischen Aggregat (63 S) zusammen, zwei solcher Aggregate bilden bei Gastropoden ein 105 S-Partikel. Jede Polypeptidkette läßt sich in acht Domänen unterteilen (M_r = 50 000), die die kleinsten funktionellen Einheiten darstellen.

Arthropodenhämocyanine liegen artspezifisch als Aggregate vor, die mit 16 S, 24 S, 34 S oder 60 S sedimentieren (van Holde and van Bruggen, 1971). Bei Verschieben des pH in alkalische Bereiche dissoziieren sie in ihre Untereinheiten, die mit ca. 5 S sedimentieren und ein Molekulargewicht von etwa 75 000 haben. Jede Untereinheit ist eine einzige Polypeptidkette, die zwei Kupferatome enthält und damit die kleinste funktionelle Einheit darstellt. Die 16 S-Partikel sind Hexamere, welche zweckmäßig auch als (1 x 6) - Strukturen bezeichnet werden, da sie die kleinste physiologische Einheit darstellen; die höheren Aggregationsstufen sind als (2 x 6), (4 x 6) oder (8 x 6) - Strukturen (entsprechend 24 S, 34 S und 60 S) zu bezeichnen. Die Hexamere stellen sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 90 A dar.

Jeder dieser Hämocyanintypen zeigt kooperative Bindungseigenschaften gegenüber Sauerstoff. Die Hillkoeffizienten erreichen Werte bis zu 9. Außerdem haben Hämocyanine meist ausgeprägte Bohreffekte.
Im Laufe der letzten Jahre gelang es, Hämocyanin-Untereinheiten zu isolieren und chemisch zu charakterisieren. Dabei wurde eine Heterogenität auf der Ebene der Polypeptidketten festgestellt (Lamy et al., 1970, 1977; Carpenter and van Holde, 1973; Murray and Jeffrey, 1974; Sullivan et al., 1974, Sugita and Sekiguchi, 1975; Schneider et al., 1977). Es konnten bis zu 12 verschiedene Untereinheiten gefunden werden (Markl et al., 1979a und b)

Das Hämocyanin der amerikanischen Vogelspinne Eurypelma californicum stellt ca. 80% des Proteins in der Hämolymphe der Tiere dar. Es ist extracellulär und sedimentiert einheitlich mit $S_{20,W}$ = 36,7 S (Schmid, 1976). Durch alkalische Dissoziation gewinnt man ein Monomeren-Dimeren-Gemisch, welches mit 5,8 S sedimentiert. Die Molekulargewichte der Monomeren liegen zwischen 67 000 und 76 000, die der Dimeren bei 140 000 und 155 000 (Schneider et al., 1977). Die Untereinheiten können wieder zu 37 S-Partikeln reassoziieren, die sich im elektronenmikroskopischen Aufnahmen vom nativen 37 S-Hämocyanin nicht mehr unterscheiden lassen (Schmid, 1976; Loewe et al., 1977). Es ließen sich 7 verschiedene Polypeptidketten nachweisen und isolieren, die sich in ihrer Primärstruktur und ihrem immunologischen Verhalten deutlich unterscheiden (Schneider et al., 1977; Markl et al., 1979c; Lamy et al., 1979; Strych, 1981). Zwei dieser Untereinheiten liegen als stabiles Heterodimer bc vor, das nur in Gegenwart von 4 M Harnstoff gespalten werden kann,

während Untereinheit f nach alkalischer Dissoziation des Hämocyanins teilweise als Homodimer ff gefunden wird.

Es stellt sich nun die Aufgabe, die Rolle der einzelnen Untereinheiten in der Architektur des 37 S - Hämocyanins der Vogelspinne aufzukären und ihren Beitrag zur Funktion des Gesamtmoleküls aufzuzeigen. Dazu werden, ausgehend von Versuchen von Schmid (1976), Dissoziations- und Reassoziationsexperimente mit dem Gemisch aller Untereinheiten oder einzelnen Untereinheiten durchgeführt. Durch Quervernetzung des undissoziierten nativen Hämocyanins mit bifunktionellen Imidaten und anschließende Dissoziation wurden Bruchstücke gewonnen, in denen die Untereinheiten in der nativen Anordnung vorliegen. Es soll an Hand dieser Ergebnisse ein Modell der Quartärstruktur des Hämocyanins entworfen werden. Schließlich wurden die biophysikalischen Untersuchungen von Loewe (1972, 1975, 1978) ergänzt, wobei erstmals auch die isolierten Untereinheiten untersucht wurden.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Alle Reagenzien waren von p.a. Qualität. Sie wurden von Merck bezogen mit Ausnahme von

Biogel A 0,5 m Biogel A 1,5 m Biogel A 5 m	Biorad, Richmond, Californien
Ultrogel AcA 44 Ultrogel AcA 54 Agarose M	LKB - Produkter, Bromma, Schweden
Sephadex G-100 sf, G-150 sf, G-200 sf	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Trypsininhibitor aus Sojabohne	Boehringer, Mannheim
Stickstoff Sauerstoff 2% Sauerstoffeichgas 5% Sauerstoffeichgas 10% Sauerstoffeichgas	Linde, München
Acrylamid N,N'-Methylenbisacrylamid Natriumdodecylsulfat (SDS)	Schuchardt, München
Dimethylsuberimidat·2 HCl Dimethyl-3,3-dithiobis-propionimidat, Dihydrochlorid Methyl-4-Mercaptobutyrimidat Dithiobis (Succinimidyl-Propionat)	Pierce, Rochford, Illinois, USA
Coomassie Brilliant Blue N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg

2. Tiere, Tierhaltung und Hämolymphegewinnung

Die Vogelspinne Eurypelma californicum ist im Süden und Südwesten der USA zu Hause. Sie wurde wie schon früher beschrieben gehalten (Loewe und Linzen, 1973). Die Hämolymphe wurde ungeachtet des Geschlechts und des Alters der Tiere verwendet. Sie wurde durch Punktion des dorsal gelegenen Herzens gewonnen (Loewe und Linzen, 1973). Die Tiere wurden zuvor etwa eine Stunde bei 4°C gekühlt. Durch sofortige Zentrifugation und Entfernung des Zellmaterials wurde die Gerinnung verhindert.

3. Methoden

3.1.Proteinbestimmung und UV-Spektren

Der Proteingehalt wurde routinemäßig durch Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, daß eine Extinktionseinheit ungefähr 1 mg Protein/ml entspricht (Loewe und Linzen, 1973). Die Spektren des Hämocyanins wurden mit einem Spektralphotometer 118 der Firma Cary aufgenommen.

3.2. Isolierung des 37 S-Hämocyanins und der Untereinheiten

Das 37 S-Hämocyanin wurde über Biogel A 5 m in Tris/ HCl, pH 8,0 (I=0,05),vom Begleitprotein abgetrennt. Das Hämocyanin wurde gegen Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6 (I = 0,05) dissoziiert und nach Schneider et al. (1977) in Dimere und Monomere über Sephadex G-100 sf oder Ultrogel AcA 44 mit demselben Puffer fraktioniert. Die Untereinheiten wurden durch präparative Polyacrylamidgelelektrophorese (Schneider et al. 1977) und Ionenaustauschchromatographie (Markl et al., 1979) isoliert. Aufbewahrt wurden die isolierten Untereinheiten in Glycin/ NaOH-Puffer, pH 9,6 (I = 0,05) bei 4°C.

3.3. Pufferspezies

a) Für die Dissoziationsversuche wurden folgende Puffersysteme verwendet:
Glycin/NaOH, pH = 9,6, I = 0,05,
mit oder ohne Zusatz von 5 mM Cystein, 10 mM EDTA, 1 - 4 M Harnstoff, 2% Dithiothreitol oder 2% ß - Mercaptoäthanol.
b) Für die Reassoziationsversuche wurden verwendet:
0,1 M Tris/HCl, pH 7,0 – 8,0, und 0,05 M Tris/HCl, pH 7,5 - 8,0, mit dem jeweils angegebenen Zusatz von zweiwertigen Ionen, $MgCl_2$ und $CaCl_2$).
Andere Puffer werden an entsprechender Stelle näher beschrieben.

3.4. Dialysen

Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte die Abtrennung niedermolekularer Bestandteile oder ein Pufferwechsel durch Dialyse in Visking-Dialysierschläuchen der Firma Serva. Es wurde bei 4°C gegen ein mindestens 1000-faches Volumen wenigstens 12 Stunden unter Rühren dialysiert. Das vorherige Auskochen der Schläuche in destilliertem Wasser zeigte keinen Einfluß auf die Reassoziationsversuche und die Sauerstoffbindungseigenschaften.

3.5. Konzentrierungsmethoden

Kleine Volumina von Proteinproben wurden in "Minicon" Kammern der Firma Amicon eingeengt. Größere Mengen wurden durch Ammonsulfatfällung (60% Sättigung), durch Einrotieren bei 30°C unter vermindertem Druck, durch Unterdruckfiltration in ViskingDialyseschläuchen oder durch Dialyse gegen 20% Polyäthylenglykol in Wasser konzentriert.

3.6. Elektrophoresen

a) Analytische Plattengelelektrophorese (PAGE)

Verwendet wurden Polyacrylamidplattengele mit einer Schichtdicke von 1,5 mm, die mit einem 3%igen Sammelgel pH = 6,8 versehen waren. Die Elektrophoresen wurden in einer Appa-

ratur der Firma Hölzel durchgeführt. Sie erfolgten bei pH 8,8 nach der Methode von Laemmli (1970) in linearen Acrylamid - Konzentrationsgradienten von 5-10% bzw. 5-15%. Die Laufzeit betrug 4 Stunden bei 200-250 oder 12 h bei 80 V. Die günstigste Auftragmenge war 15 ug Protein pro Bande.

b) Analytische SDS Acrylamidplattengelelektrophorese (SDS - PAGE)

Hierbei wurden dem Trenngel, Elektrodenpuffer und Sammelgel 2% SDS (sodium dodecyl sulfate) zugegeben. Ansonsten wurde wie oben verfahren. Vorher wurden die Proteine nach der Methode von Weber and Osborn (1969) mit Hilfe von SDS denaturiert.

c) Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese

Sie wurde in einer "Ultraphor" Apparatur der Firma Colora (Lorch) mit einem 3,5 - 6 %-igen Gel durchgeführt. Das Puffersystem Nr. 1 nach Maurer (1968) kam zur Anwendung. Es wurde wie bei Schneider et al. (1977) verfahren, jedoch mit dem Unterschied, daß die Gelhöhe 80 mm betrug und die Proteinmenge bis auf 60 mg erhöht wurde.

d) Mikropräparative Plattengelelektrophorese

Sie wurde mit einem 4% bzw. 5% kontinuierlichem Gel in einer analytischen Elektrophoreseapparatur (Hölzel, Dorfen) durchgeführt, die mit einer Elutionskammer ausgestattet war. Die Versuche wurden von Frau M. Brenzinger durchgeführt.

e) Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die zweidimensionale Immunelektrophorese wurde nach Weeke (1973) von Herrn Dr. J. Markl durchgeführt. 1% Agarose M (LKB) in 0,12 M Natriumbarbituratpuffer pH = 8,6, I = 0,02 wurde für die Gelzubereitung verwendet. In der zweiten Dimension wurden 2-4 ml Antiserum pro 100 ml eingesetzt. Als Trägermaterial wurden Plastikplatten (LKB) verwendet.

Die Versuche wurden in einer LKB 2117 Multiphor-Apparatur durchgeführt.

f) Anfärben und Auswerten der Gele

Die Banden wurden mit Coomasie Brilliant Blue G 250 (Bramhall et al. 1969; Weber und Osborn, 1969) gefärbt.
Zur quantitativen Auswertung der gefärbten Gele wurden sie mit dem Joyca - Loebl Mikrodensitometer 3 GS (Chromoscan 200) ausgemessen. Die gewonnenen Peaks wurden planimetrisch mit Hilfe eines Digitalisiertabletts (Summagraphics) ausgewertet, das mit einem Tektronix TEK 31 Tischcomputer verbunden war. Dem Programm lag das Prinzip der Flächenintegration zu Grunde. Es ist im Anhang 1 zu finden.

3.7. Gelchromatographische Methoden

a) Säulengelchromatographie

Zur säulengelchromatographischen Auftrennung von Untereinheitengemischen, Reassoziaten und Quervernetzungsprodukten wurden Säulen von 100 - 180 cm Länge und 0,9 - 1,5 cm Durchmesser verwendet. Benutzt wurden Biogel 1,5 m und Biogel A 5 m (200-400 mesh). Die Durchflußgeschwindigkeit betrug bis 4 ml/h. Die Wahl des Puffers richtete sich nach der jeweiligen Zielsetzung des Versuches.

b) Dünnschichtgelchromatographie (DGC)

Verwendet wurde die Apparatur der Firma Pharmacia. Vorgegangen wurde nach Gebrauchsanleitung. Für die Trennung von 37 S-, 24 S-, 16 S-, 7 S- und 5 S-Hämocyaninen waren die Gele Sephadex G 200 sf und Sephadex G 150 sf am geeignetsten. Während des Laufes hatte die Platte einen Winkel von 30° zur Horizontalen. Die Laufzeit betrug 8 h. Der Abklatsch wurde mit dem Filterpapier Whatman 3 MM angefertigt und

dann mit Coomasie Brilliant Blue G 250 angefärbt (nach Gebrauchsanleitung).
Als Eichsubstanzen dienten 37 S-Hämocyanin, das Heterodimer bc sowie die Monomeren von Eurypelma californicum und 24 S- und 16 S-Hämocyanin von Cupiennius salei.

3.8. Analytische Ultrazentrifugation

Es wurde eine analytische Ultrazentrifuge Modell E von der Firma Beckmann verwendet, die mit photoelektrischem Scanner und Multiplexer ausgerüstet war. Benutzt wurden Doppelsektorzellen mit Filled - Epon - Mittelstücken. Die Temperatur betrug 20°C, die Umdrehungszahlen 28000 - 44000 Upm.
Die Absorption wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,07 - 1 mg/ml bei λ = 280 nm, über 1 mg/ml bei λ = 293 nm aufgezeichnet. Die Bestimmung der Sedimentationkoeffizienten erfolgte graphisch nach Elias (1969) auf Grund der Gleichung:

$$(S)_{app} = \frac{2{,}303}{\omega^2} \cdot \frac{d \lg r_i}{d t}$$

ω = Winkelgeschwindigkeit
r_i = innerer Radius von Drehachse bis zur Mitte der Sedimentationsbande.
Bei den Versuchen mit niedrigen Proteinkonzentrationen in sehr verdünnten Puffern wurde auf die Berechnung der Sedimentationskonstante $S_{20,W}$ verzichtet (vgl. Chervenka, 1973).

3.9. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Frau W. Schutter im Laboratorium von Prof. Dr. E. van Bruggen, Universität Groningen (Holland), durchgeführt. Die Proben hatten eine Proteinkonzentration von 1-2 mg/ml und wurden

auf Kupfernetze mit 60-70 um starken Kohlefilmen aufgesprüht (spraydroplet technique) und nach Brenner und Horne (1959) negativ kontrastiert. Dazu wurde ungepuffertes 1% Uranylacetat (pH 5) verwendet (Siezen and van Bruggen, 1974). Die Aufnahmen wurden in einem Gerät der Firma Jeol, Typ JEM 100 B untersucht. Die Primärvergrößerung war 60000 - fach.
Film: Eastman - Kodak fine grain release positive film 53oo2
Platten: Kodak Elektron image plates

3.10. Sauerstoffbindungskurven

Kontinuierliche Sauerstoffbindungskurven wurden mit der photometrisch polarographischen Methode nach Loewe und Linzen (1975) gewonnen. Jedoch kam ein Eppendorf 1101 M Photometer mit einem lin/log Konverter Modell 1855 zum Einsatz. Benutzt wurden Filter für 313, 334 oder 366 nm. Die Proteinkonzentration betrug 0,3 - 2,5 mg/ml, das Probenvolumen 0,7 ml. Die Temperatur betrug, wenn nicht anders beschrieben 20,0 $\pm$ 0,1^{o}C. Für Proben mit sehr geringer Proteinkonzentration wurde die fluorimetrisch-polarographische Methode von Loewe (1978) verwendet. Dabei wurde die Hämocyanin-Fluoreszenz bei 350 nm gemessen. Der pH wurde vor und nach jeder Messung bei den entsprechenden Versuchsbedingungen überprüft. Die Sauerstoffbindungskurven wurden von Hand oder mit Hilfe eines Digitalisiertabletts (Summagraphics), das mit einem Tektronix TK 31 Tischrechner verbunden war, ausgewertet. Das Programm zur Berechnung der Parameter im Hillplot ist in Anhang 2 aufgeführt.

3.11. Enzymatische Spaltung an nativen Polypeptidketten und am nativen 37 S Hämocyanin

Diese Versuche wurden von Herrn Werner Strych durchgeführt (Dissertation, München 1981). 37 S-Hämocyanin und "native", durch Dissoziation bei pH 9,6 erhaltene Polypeptidketten wurden mit Trypsin gespalten. Dazu wurde vorher bei

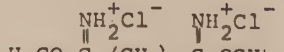
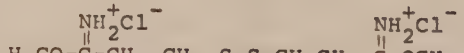
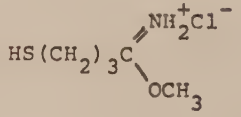
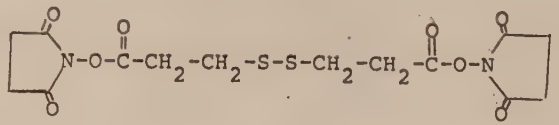
4°C gegen 0,1 M (NH_4) HCO_3 pH 8,0 dialysiert. Die Proben wurden dann mit 2 - 5% Trypsin (bezogen auf die Proteinmenge) 90, 120, 210 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Trypsininhibitor aus Sojabohnen abgestoppt (Kunitz, 1947).

3.12. Quervernetzung des 37 S Hämocyanins mit bifunktionellen Imidaten

Zum Einsatz kamen folgende Quervernetzungsreagenzien ("cross - linking" - Reagenzien): Dimethylsuberimidat (DSI), Dimethyl-3,3-dithiobispropionimidat (DTBP), Methyl-4-mercaptobutyrimidat (MMB) und Dithiobis- (succinimidyl) -propionat (DTBP). Alle wurden von der Firma Pierce gekauft. Über Struktur, Länge und entsprechende Referenzen gibt Tab. 1 Auskunft.

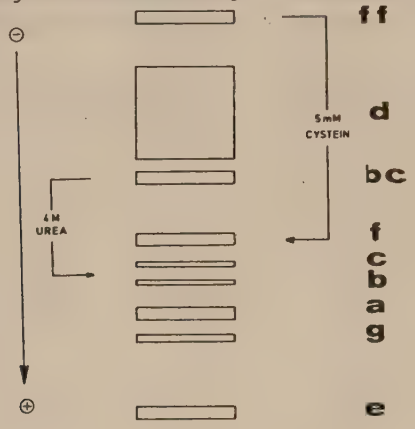
Reaktionsbedingungen: Die Dialyse des Hämocyanins (c = 0,1 - 10 mg/ml) erfolgte gegen 3 x 1000 ml 0,2 M Triäthanolamin (TEA) / HCl, pH 8,0, bei 4°C über 30 h. Die Hämocyaninlösung wurde mit einer äquivalenten Menge von frisch angesetzten Quervernetzungsreagenzien (DSI, DTBP, und MMB), in 1 M TEA/HCl, pH 8,0, (c = 20 - 100 mg/ml), über 5 - 180 min bei 4 - 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Dialyse gegen mindestens 1000 fachen Pufferüberschuß oder durch Zugabe eines 20 - 100 fachen Überschusses an Lysinmonohydrochlorid beendet. Die Entfernung überschüssiger Reagenzien erfolgte durch Dialyse gegen 0,1 M TEA/HCl Puffer, pH 8,0, bei 4°C über 12 - 24 h. Anschließend wurden die Proben gegen den entsprechenden Analysepuffer dialysiert. Zur Disulfidbrückenbildung bei MMB wurde in Analogie zu Sun et al. (1974) verfahren.

Tab.1: Strukturformel, Länge und entsprechende Referenzen der verwendeten Vernetzungsreagenzien

Name	Strukturformel	Länge (Å)	Referenzen
Dimethylsuberimidat·2HCl (DSI)		~12	Clegg and Hayes, 1974 Hajdu et al., 1976
Dimethyl-3,3-dithiobis-propionimidat-Dihydro-chlorid (DTBP)		~12	Wang and Richards,1974 Ruoho et al., 1975
Methyl-4-Mercaptobutyrimidat		~15	Traut et al.,1973 Sun et al.,1974
Dithiobis (Succinimidyl Propionat) (DTSP)		~11	Lomant and Fairbanks,1976 Bragg and Hou,1976

3.13. Nomenklatur und Abkürzungen

37 S-Hämocyanin dissoziiert nach einer Verschiebung des pH auf 9,6 in seine Untereinheiten. In der alkalischen Plattengelelektrophorese ergibt sich folgende Bandenverteilung und Bezeichnung (aus Markl et al., 1979c)



Hc = Hämocyanin; Hb = Hämoglobin; UE = Untereinheiten;
EM = Elektronenmikroskopie
DSI = Dimethylsuberimidat;
DTBP = Dimethyl-3,3-dithiobispropionimidat;
DTSP = Dithiobis (Succinimidyl-Propionat);
MMB = Methyl-4-Mercaptobutyrimidat;
DPG = 2,3-Diphosphoglycerat;

16 S = Aggregat, das mit 13-16 S sedimentiert
18 S = " " " 17-18 S "
24 S = " " " 22-25 S "
28 S = " " " 26-29 S "
37 S = " " " 31-36 S "

(1x6) = 1x " würfelförmige Struktur " im EM,
(2x6) = 2x " " " " ,
(3x6) = 3x " " " " ,
(4x6) = 4x " "" "" " " ,

Zur Sauerstoffbindung:
P_{50}= Halbsättigungsdruck in Torr
n_{50}= n_H=Hillkoeffizient beim Halbsättigungsdruck,
n_{max}= Maximaler Hillkoeffizient
y = relatives Maß der Sättigung des Proteins mit Sauerstoff, bei 100%-iger Sättigung ist y=1;

C.ERGEBNISSE

1. Einfluß verschiedener Parameter auf das Reassoziationsverhalten

Schon in früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß sich dissoziiertes Eurypelma Hämocyanin wieder zu Molekülen reassoziieren läßt, die vom nativen Hämocyanin elektrophoretisch, durch Sedimentationsanalyse und im Elektronenmikroskop nicht zu unterscheiden sind. Die Reassoziation aus den Untereinheiten läuft relativ langsam ab. Bei einer Konzentration von 5 mg/ml, 25°C in 0,1 M Tris/HCl-Puffer in Gegenwart von 1 m M Mg^{2+} werden 20 Tage bis zur vollständigen Reassoziation benötigt (Schmid, 1976). Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Parameter auf die Reassoziation hat schon Schmid (1976) in Angriff genommen. Die vorliegenden Versuche knüpfen an seine Ergebnisse an.

Zuerst wurde die Abhängigkeit der Reassoziation von der Temperatur und dem pH untersucht. Als Bedingungen wurden 5°C und 20° C, sowie pH 7,5 und 8,0 gewählt. (Abb. 1).

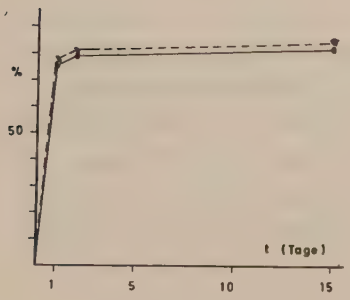


Abb.1: Einfluß der Temperatur auf die Reassoziation von dissoziiertem 37 S-Hämocyanin. Reassoziationsbedingungen: 0,1 M Tris/HCl-Puffer, c_{Hc} = 2 mg/ml; —— bei 4°C (pH = 7,5; ● ; pH = 8,0; ○) - - - bei 25°C (bei pH = 7,5; ▲ ; pH = 8,0; ▽).

Nach 24 h beträgt in jedem Fall der Anteil an reassoziiertem 37 S-Hämocyanin[§] 75%. Die Ausbeute erreicht nach 15 Tagen 84%. Sie hängt dabei nicht signifikant von der Temperatur oder dem pH ab. Alle weiteren Versuche wurden bei 4°C und pH 8,0 durchgeführt, dem pH der höchsten Kooperativität (Loewe, 1978).

Außerdem wurde weiterhin mit dem Puffer Tris/HCl gearbeitet, da er von allen untersuchten Puffersystemen den größten 37 S-Anteil liefert (Schmid, 1976). Reassoziiert man in Gegenwart von steigenden Mg^{2+} Konzentrationen, so bleibt die Ausbeute an 37 S trotzdem fast gleich hoch (57% bei 0,01 mM Mg^{2+}, 59% bei 100 mM Mg^{2+} nach 2 Tagen; Abb. 2). Bei hohen Mg^{2+}- Konzentrationen (100 mM) erhält man ein Material mit ungewöhnlich hohem Sedimentationskoofizienten (38 - 40 S). Der 6 S-Anteil nimmt dabei ab (Abb. 2).
Reassoziiert man hingegen in Gegenwart von verschiedenen Ca^{2+} Konzentrationen, gewinnt man nach 18 h schon ca. 70% 37 S-Hämocyanin (73% bei 0,5 mM Ca^{2+} und 71% bei 40 mM Ca^{2+}) ist jedoch kleiner als in Gegenwart von Mg^{2+} (42% bei 1 mM Mg^{2+}). Der Anteil an 6 S-Hämocyanin scheint mit zunehmender Ca^{2+} - Konzentration zu Gunsten von 16 S - Molekülen abzunehmen (Abb. 2). Diese liegen bei 5 mM Ca^{2+} zu 30% vor und bleiben bei höheren Ca^{2+} - Konzentrationen konstant. Die geringfügige Zunahme an 37 S-Hämocyanin nach

---

[§]In der Regel wurden drei Proteinbanden beobachtet, die mit 33 - 36 S, 12 - 16 S und 5 - 6 S sedimentierten. Diese werden im Folgenden als 37 S-, 16 S- und 5 S-Hämocyanine bezeichnet.

66 h auf 77% ist von der Ca^{2+} - Konzentration unabhängig (Abb. 3). Der 16 S-Anteil nimmt nach einem Durchlaufen eines Maximums nach 1 - 2 Tagen (30%) wieder ab.

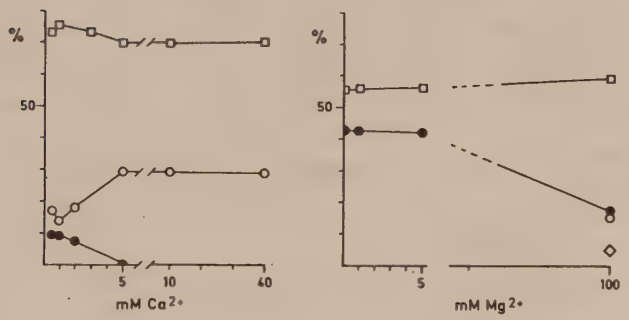


Abb.2: Einfluß von Ca^{2+} und Mg^{2+} auf die Reassoziation von dissoziiertem 37 S-Hämocyanin.
Reassoziationsbedingungen: Dialyse über Nacht bei Raumtemperatur gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0; Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} wie angegeben; c_{Hc} = 2 mg/ml;
□ = 37 S, ○ = 16 S, ● = 6 S, ◇ = ca. 50 S.

Variiert man die Proteinkonzentration in Abwesenheit von zweiwertigen Ionen, so beträgt nach 12 h der prozentuale Anteil 37 S-Hämocyanin 26% bei 0,1 mg/ml, aber nur 73% bei 1,6 mg/ml. Bei 0,6 mg/ml werden intermediäre Komponenten (ca. 16 S und ca. 24 - 28 S) beobachtet, die ab 1,2 mg/ml nicht mehr auftreten (Abb. 4).
Variiert man die Proteinkonzentration in Gegenwart von 5 mM Ca^{2+}, so erhält man nach 18 h einen ca. 80%-igen Anteil an 37 S-Hämocyanin, der bei ansteigender Proteinkonzentration konstant bleibt (Abb. 5). Dabei tritt schon bei einer geringen Konzentration von 0,2 mg/ml eine 16 S-Hämocyaninkomponente auf. Der Anteil von 10% steigt

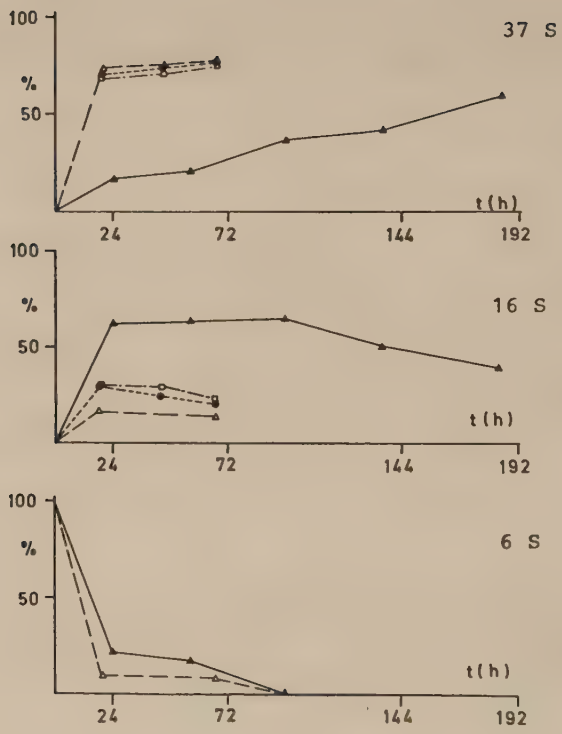


Abb.3: Verlauf der Reassoziation von 37 S-Hämocyanin aus dem Gemisch der Untereinheiten (des bei pH 9,6 dissoziierten Hämocyanins) in Gegenwart von verschiedenen Ca^{2+} Konzentrationen.
Reassoziationsbedingungen: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, Raumtemperatur, ▲ = 0,5 mM Ca^{2+}; ● = 1 mM Ca^{2+}; □ = 5 mM Ca^{2+}; c_{Hc} = 1mg/ml. Als Vergleich wurden die entsprechenden Daten für eine Proteinkonzentration von 0,25 mg/ml aus der Dissertation von Schmid (1976) herangezogen(▲)

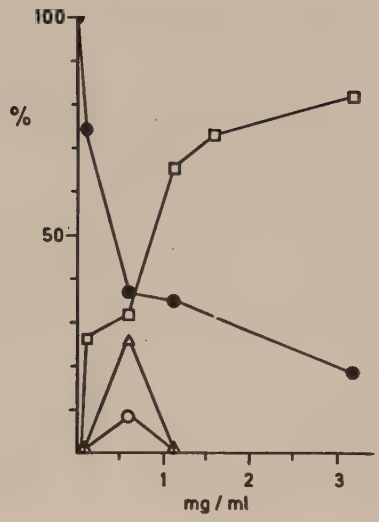
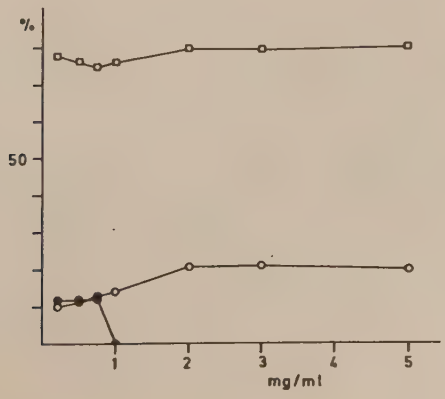


Abb.4: Einfluß der Proteinkonzentration auf die Reassoziation von dissoziiertem 37 S-Hämocyanin. Reassoziationsbedingungen: Dialyse über Nacht bei Raumtemperatur gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer bei pH 8,0. Ca^{2+} und Mg^{2+} fehlten; □ = 37 S, △ = 24-28 S, ○ = 16 S, ● = 6 S.

Abb.5: Einfluß der Proteinkonzentration auf die Reassoziation von dissoziiertem 37 S-Hämocyanin in Gegenwart von Ca^{2+}.
Die Reassoziationsbedingungen waren die gleichen wie bei Abb.4, jedoch war 5 mM Ca^{2+} anwesend.



auf 20% bei 1 mg/ml, und bleibt konstant, während ein 6 S-Hämocyaninanteil ab dieser Proteinkonzentration nicht mehr zu beobachten ist. Es ist hier nochmal wichtig festzustellen, daß 37 S-Hämocyanin auch in Abwesenheit von Mg^{2+} und Ca^{2+} gebildet werden kann.

Die Ionenstärke hat hingegen einen gewichtigen Einfluß auf die Reassoziation (Abb. 6). Während in Puffer mit Ionenstärke I = 0,001 nach 24 h nur 6 S-Hämocyanin zu beobachten ist, wurden fast 60% 37 S-Hämocyanin bei I = 0,1 gefunden. Bei I = 1,0 treten nur 16 S-Partikel auf, der Rest von ca. 50% bleibt dissoziiert. Andererseits kann man die Dissoziation bei pH 9,6 innerhalb der ersten 90 Minuten durch hohe Ionenstärke (1 M NaCl) unterdrücken (Schmid, 1976).

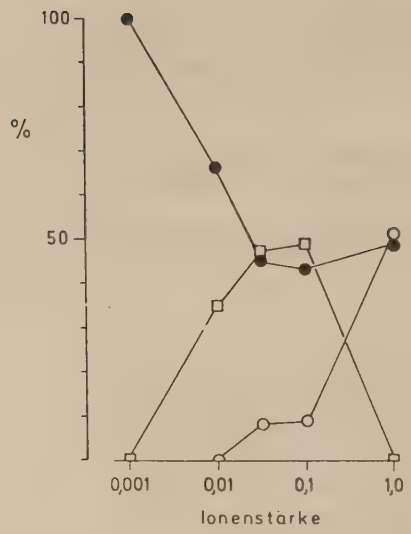


Abb.6: Einfluß der Ionenstärke auf die Reassoziation von dissoziiertem 37 S-Hämocyanin.
Reassoziationsbedingungen: Dialyse über Nacht bei Raumtemperatur gegen Tris/HCl Puffer, pH 8,0. c_{Hc} = 2 mg/ml
□ = 37 S-, ○ = 16 S-,
● = 6 S-Hämocyanin.

2. Bedeutung des auftretenden Hexamers bei der Reassoziation

In den meisten bis jetzt beschriebenen Experimenten traten außer 6 S- und 37 S-Molekülen auch 16 S-Moleküle (Hexamere) auf. Dabei fällt auf, daß bei einer zeitlichen Betrachtung der Reassoziation der Anteil an 16 S-Partikeln durch ein Maximum geht, und dann wieder langsam abnimmt. Dabei nimmt der 37 S-Anteil in gleichem Maße zu. Somit erscheint die 16 S-Komponente auf den ersten Blick als ein Zwischenprodukt bei der Reassoziation.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurde das 16 S- Intermediat in größeren Mengen hergestellt. Dazu wurde dissoziiertes Hämocyanin bei einer Konzentration von 3 - 5 mg/ml 3 Tage lang in Gegenwart vom 5 mM Ca^{2+} bei $4^{o}C$ in O,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,O, reassoziiert. Das Reassoziat wurde säulenchromatographisch getrennt (Abb. 7). Von den drei Gipfeln (I,II,III) wurden die Sedimentationskoeffizienten bestimmt. Sie betrugen 33,4 S, 15 S und 6 S. Das Flächenverhältnis der Gipfel betrug I:II:III = 65:25:10. (Der Gipfel III war nur in 2 von 6 Versuchen gut ausgeprägt). Die drei Gipfel wurden einzeln wieder bei 9,6 dissoziiert (die Überprüfung erfolgte in der analytischen Ultrazentrifuge), und das erhaltene Material unter den selben Bedingungen wie vorher erneut reassoziiert. Die Sedimentationsanalyse zeigte, daß das Material aus Gipfel I wieder hauptsächlich (4x6)-Moleküle (33,8 S) geliefert hatte, das aus Gipfel II hauptsächlich (1x6)-Moleküle (15,9 S), und das aus Gipfel III überwiegend nicht reassoziiert war (Abb.7). Das Ergebnis zeigt, daß das Material aus Gipfel II höhere Aggregate als Hexamere nicht zu liefern vermag.

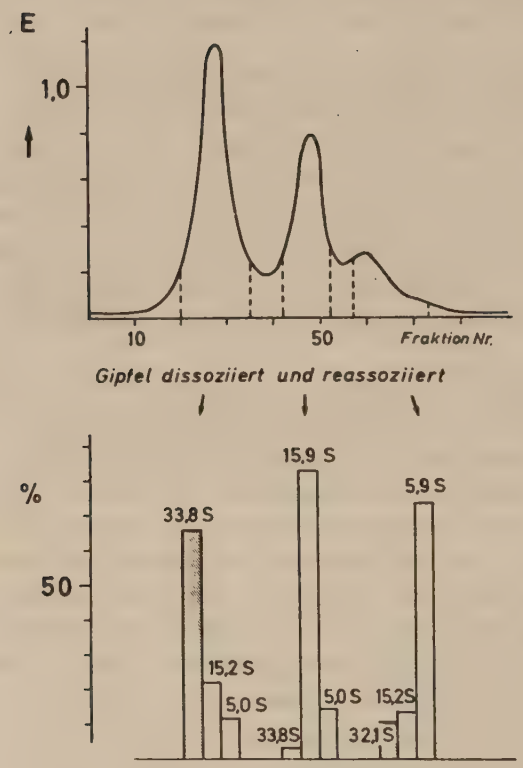


Abb.7: Oben: Säulengelchromatographische Trennung von Hämocyaninkomponenten, die aus einem komletten Untereinheitengemisch(dissoziiertes 37 S-Hämocyanin) reassoziiert wurden. Die Gipfel korrespondieren mit 37 S-, 16 S- und 6 S-Material.

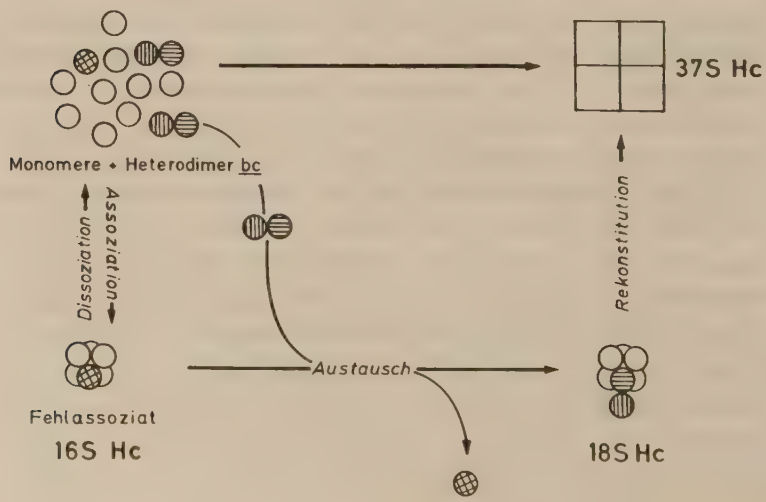
Unten: Das Material aus den einzelnen Gipfeln wurde dissoziiert, ein zweites Mal reassoziiert und dann in der analytischen Ultrazentifuge analysiert. Man beachte, daß jede Komponente vorzugsweise ein Reassoziationsprodukt mit einem Sedimentationskoeffizienten enthält, der mit dem ursprünglichen korrespondiert. Vor der zweiten Reassoziation wurde das Protein auf 1 - 2 mg/ml konzentriert. Reassoziationsbedingungen: Es wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, in Gegenwart von 5 mM Ca^{2+} dialysiert.

Kann aber das Hexamer (Gipfel II) selbst im Laufe der Zeit langsam zum (4x6)-Molekül-aggregieren? Selbst nach 12 Tagen läßt sich in der analytischen Ultrazentrifuge ausschließlich 16 S-Material nachweisen. Demnach stellt Gipfel II kein Zwischenstufe bei der Reassoziation der Untereinheiten zum 37 S-Partikel dar, sondern ist als ein Produkt einer Seitenreaktion zu betrachten. Die Ursache dafür ergibt sich aus folgendem Versuch: Wurde die Gipfelfraktion vom Gipfel II dissoziiert und die Zusammensetzung der Untereinheiten durch PAGE und zweidimensionale Immungelelektrophorese analysiert, ergab sich, daß das Hexamer alle Untereinheiten bis auf das Dimer bc enthält (Abb. 8).
Gipfel I enthielt dagegen sämtliche Untereinheiten des nativen 37 S-Hämocyanins im bekannten quantitativen Verhältnis (Abb.8). Offensichtlich ist die Assoziation bis zur (4x6)-Stufe in Abwesenheit des Dimers bc nicht möglich. Das Ergebnis läßt den Schluß zu, daß bc die Verbindung zwischen den Hexameren innerhalb des 24-mers liefert.
Da bei Reassoziation über längere Zeit hinweg der Anteil an Hexameren ab-, und der Anteil der 37 S-Partikel zunimmt, stellt sich die Frage, ob in den Hexameren einzelne Untereinheiten gegen die "richtigen" ausgetauscht werden oder, ob es vollständig dissoziieren muß und anschließend sich die "richtigen" Untereinheiten in korrekter Weise zur Bildung des 37 S-Partikels finden (Abb. 9).
Die folgenden Experimente lassen letztere Annahme für wahrscheinlicher erscheinen. Das fehlende Dimer bc wurde zu einer Präparation des Hexamers zugegeben und das Gemisch 20 Tage im Reassoziationspuffer stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden bei analytischer Ultrazentrifugation 33% 37 S-Moleküle gefunden. (Abb. 10).
Dissoziiert man den Gipfel II jedoch bei pH 9,6 und reassoziiert nach Zugabe von bc, erhält man bereits nach

Abb.8: Zweidimensionale Immungelelektrophorese der Untereinheiten, die im reassoziierten 37 S-(a) und 16 S-Hämocyanin (b) enthalten sind. Die beiden Reassoziate wurden durch Gelchromatographie (Abb.7) isoliert. Antiseren gegen das gesamte Untereinheitengemisch wurden verwendet. In der ersten Dimension war die Anode links. Die Reassoziationsbedingungen waren wie bei Abb.7. Man beachte den großen Anteil der Untereinheiten. Die Untereinheitenverteilung ergibt sich zu (gerundet):

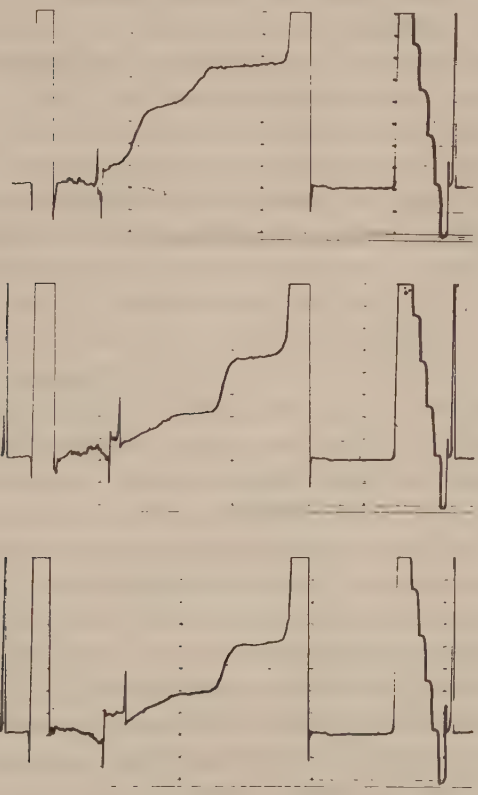
	a	d	e	f	g	b+c	Summe	
(a)	4	4	4	4	4	2+2	24	(37 S)
(b)	1	2	1	1	1	-	6	(16 S)

Abb. 9: Schematische Darstellung der Reassoziation von 37 S-Hämocyanin aus einem Gemisch von Untereinheiten. Der größte Teil assoziiert unmittelbar korrekt. Ein Teil gibt ein 16 S-Fehlassoziat.Dieses könnte entweder durch Austausch einer monomeren Untereinheit gegen das Dimer bc zum 18 S-Hämocyanin und weiter zum 37 S-Hämocyanin reagieren (unterer Weg), oder wieder vollständig in das Gemisch der Untereinheiten zerfallen.



24 h 66% 37 S-Moleküle (Abb.10). Ein ähnliches Ergebnis erhält man, wenn man zu einem Monomerengemisch bc zusetzt und unter gleichen Bedingungen inkubiert (Abb.10).

Abb.10: Sedimentationsanalyse in der analytische Ultrazentrifuge nach Inkubation des 16 S-"Fehlassoziats" mit dem Heterodimer bc (I,II)und dem Gemisch aller Untereinheiten (Monomere + bc) (III). Bei (II).wurden die 16 S-Partikel vorher dissoziiert. Reassoziationsbedingungen: Dialyse über Nacht gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 in Gegenwart von 5 mM Ca^{2+}; UV Scan, 32ooo UpM, 20°C, nach 30 min.; Komponenten jeweils von links: 6 S-, 16 S-, 37 S-Partikel.



3. Homogenität und Untereinheitenzusammensetzung des 37 S Hämocyanins

Die Frage, ob jede Untereinheit eine bestimmte Position im 37 S-Hämocyanins einnimmt, ob sie bestimmte Aufgaben bei der Strukturgebung und in der Funktion des Hämocyanins haben, kann durch Reassoziationsversuche ausgehend von isolierten Untereinheiten in den verschiedensten Kombinationen angegangen werden. Eine solche Untersuchung setzt die Annahme voraus, daß nicht sämtliche denkbaren, sondern nur bestimmte Kombinationen zu 37 S-Partikeln führen, daß also auch das native Hämocyanin nur in wenigen Varianten vorkommt oder im Extremfall sogar homogen ist. Jeffrey et al. (1977) zeigte, daß 16 S-Hämocyanin von Cherax destructor heterogen ist. Entsprechend dem Gehalt an zwei verschiedenen Untereinheiten konnten bis zu sieben elektrophoretisch unterschiedliche Hexamere gefunden werden. Bei Reassoziationsexperimenten traten die beiden Untereinheiten offensichtlich statistisch zusammen. Beim Hämocyanin von Eurypelma californicum konnte mit Hilfe von Elektrophorese, Isoelektrofokussierung, zweidimensionaler Immunelektrophorese und Ionenaustauschgelchromatographie gezeigt werden, daß es offensichtlich homogen ist. (Savel, 1979; Markl et al., 1980). Das bedeutet aber auch, daß in jedem 37 S Partikel alle Untereinheiten enthalten sein müssen.

Eine quantitative Bestimmung der Untereinheiten im Eurypelma-Hämocyanin wurde durch Flächenauswertung der Gipfel nach Gelfiltrationsexperimenten und präparativer Discelektrophorese, und durch entsprechende Auswertung von Densitogrammen nach Gelelektrophorese von 37 S-Hämocyanin Dissoziaten sowie durch Flächenauswertung der Gipfel nach zweidimensionaler Immunelektrophorese unternommen (Markl et al., 1980). Dabei ergab sich

die Untereinheitenverteilung von a + b + c + d + e + f + g = 6 + 2 + 2 + 4 + 4 + 4 + 2.
Die Untereinheiten a und g konnten nur schwer getrennt werden, ergaben aber zusammen immer die Summe 8. Von den drei in Frage kommenden Möglichkeiten 6 + 2, 5 + 3, 4 + 4 wurde zunächst 6 + 2 als die wahrscheinlichere angesehen (Markl et al., 1980). Auf Grund neuester Versuche muß jedoch von einem Verhältnis a : g = 1 : 1 ausgegangen werden (Markl, persönliche Mitteilung). Im Folgenden sollen letztere Ergebnisse berücksichtigt werden: a + g = 4 + 4 .

4. Reassoziation einzelner Untereinheiten

Es bot sich nun an, das Reassoziationsverhalten der einzelnen isolierten Untereinheiten zu untersuchen. Dazu waren zuerst Vorversuche notwendig, die Auskunft über die optimalen Versuchsbedingungen geben sollten.

4.1. Vorversuche

a) Allgemeines

Es wurden Gemische von isolierten Untereinheiten in allen möglichen Kombinationen reassoziiert. Dabei wurden sie in solchen Konzentrationen zugegeben, daß gleichbleibende Proteinendkonzentrationen resultierten, also gleiche Kollisionswahrscheinlichkeiten in allen Versuchen gegeben waren. Zu beachten war auch, daß Massenwirkungseffekte möglichst vermieden werden sollten. Da aus Abb.4 hervorgeht, daß eine Erhöhung der Proteinkonzentration über 1 mg/ml nicht mehr zu einer wesentlichen Erhöhung der Ausbeute an 37 S-Hc innerhalb von 18 h führte, jedoch die Gefahr von mittelstabilen Fehlassoziaten sicherlich erhöht wurde, wurde im Folgenden mit einer Proteinendkonzentration von 1 - 2 mg/ml gearbeitet. Eine Reasso-

Tabelle 2: Einfluß von Ionenstärke, pH und Ionen auf die Reassoziation. Die Ergebnisse wurden mittels Dünnschichtgelchromatographie, Sephadex G 200 sf, Laufzeit 8 h gewonnen.

	Untereinheiten	Tris/HCl-Puffer	Bildung von 16 S-Hc	37 S-Hc
	Monomere + bc	0,05 M, pH 7,5		++
(a)		0,05 M, pH 7,5		
	Monomere		++	
	Monomere + bc			++
(b)		0,1 M, pH 7,5		
	Monomere		++	
	Monomere + bc			+
(c)		0,1 M, pH 7,5, 5+5 mM $CaCl_2$+ 10 mM $MgCl_2$		
	Monomere		+	
	Monomere + bc			++
(d)		0,1 M, pH 8,0		
	Monomere		o	

++ 100 % Reassoziation
+ 50 % Reassoziation
o Spuren von Reassoziaten
- keine Reassoziation

ziationszeit von 18 h bei 20 ± 2°C erwies sich als voll ausreichend.
Die Untereinheiten wurden, wie unter B 3.2. beschrieben, isoliert und in der zweidimensionalen Immunelektrophorese auf ihre Reinheit hin untersucht. Vor den Reassoziationsversuchen wurden sie gegen 0,05 M Glycin/NaOH, pH 9,6 dialysiert.
Zuerst wurde mit dem Gemisch sämtlicher Untereinheiten der Einfluß verschiedener Puffer und verschiedener pH-Werte verglichen (Tab. 2). Es war kein Unterschied zwischen 0,05 und 0,1 M Tris/HCL-Puffer, pH 7,5 zu erkennen. Bei pH 8,0 reassoziierte dissoziiertes 37 S - Hämocyanin wieder quantitativ zu 37 S-Hämocyanin; ein Monomerengemisch reassoziierte hingegen nicht quantitativ zu 16 S-Partikeln. In Gegenwart von 5 mM $CaCl_2$ und 10 mM $MgCl_2$ - wie dies bei Versuchen von Schneider (1978) und von van Bruggen et al. (1980) der Fall war — war die Ausbeute an 37 S- bzw. 16 S-Hämocyanin geringer. Es wurden alle Versuche einmal in An-, ein weiteres Mal in Abwesenheit von 10 mM EDTA durchgeführt. Beim Versuch (c) aus Tab. 2 wurde in entsprechender Weise verfahren, jedoch dann zusätzlich gegen den Ca^{2+} und Mg^{2+} - haltigen Puffer, pH 7,5, dialysiert ("two-step" - Verfahren). Auch hier war kein Unterschied in der Ausbeute festzustellen. In den folgenden Versuchen wurde auf EDTA verzichtet, da es eine destabilisierende Wirkung hat (Bijlholt et al., 1979). Außerdem wurde mit 0,1 M Tris/ HCl pH 7,5 gearbeitet. Pro Kombination wurden mindestens 2 Versuche durchgeführt.
Aus den quantitativen Analysen des nativen 37 S Hämocyanins (Markl et al., 1980) geht hervor, daß die Untereinheiten in sehr einfachen Verhältnissen auftreten. Sie betragen ein Sechstel, bei b und c jeweils ein Zwölftel. Da die unter C.1 und 2 geschilderten Versuche gezeigt haben, daß prinzipiell auch Fehlassoziationen stattfinden können, war es angezeigt, die einzelnen Untereinheiten

Tabelle 3: Einfluß des Mischungsverhältnisses von Monomere : bc auf das Reassoziationsvermögen; die Ergebnisse wurden dünnschichtgelchromatographisch gewonnen 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5

Verhältnis			Resultat
Monomere	:	bc	
1	:	1	-
1	:	3	-
1	:	5	-
1	:	10	-
3	:	1	37 S ("sehr viel")
5	:	1	37 S ("sehr viel")
10	:	1	37 S ("sehr viel")

in ausgewogenen Verhältnissen in die Versuche einzusetzen. Insbesondere hatte das für das Heterodimer bc zu gelten, nachdem die Versuche von van Bruggen et al. (1980) gezeigt hatten, daß es benötigt wird, um Aggregate, die größer sind als Hexamere, aufzubauen. Da b und c nur sehr schwer sauber zu trennen waren, wurde mit dem isolierten Heterodimer bc gearbeitet. Es wurde immer mit einem Verhältnis Monomere : bc = 3 : 1 bis 5 : 1 gearbeitet, da hier die Ausbeute an 37 S-Partikeln am größten war (Tab.3).

Die Reassoziate wurden je nach Bedarf nach 5 verschiedenen Methoden untersucht:
- in der Dünnschichtgelchromatographie (DGC)
- im Elektronenmikroskop (EM)
- in der analytischen Ultrazentrifuge (UZ)
- in der analytischen Plattengelelektrophorese (PAGE)
- in der zweidimensionalen Immunelektrophorese (IE)

b) Zur Dünnschichtgelchromatographie

Sie erlaubt eine rasche qualitative und halbquantitative Übersicht. Als Eichproteine wurden 37 S-Hämocyanin, Dimere (6,6 S), und Monomere (4,4 S) aus Eurypelma, und 24 S-Hämocyanin und 16 S-Hämocyanin aus Cupiennius salei verwendet. Die Intensität der Flecken wurde mit dem Auge verglichen. War sie so intensiv wie die Referenzen, so wurde die Reassoziation als 1oo-prozentig bezeichnet, war sie etwa halb so intensiv, entsprechend als 5O-prozentig. Die Reassoziation galt dann als erfolgreich, wenn ein bestimmtes Produkt zu mindestens 50% vorlag, d.h. es wurden nur eindeutige Versuchsergebnisse gewertet.

c) Zur analytischen Ultrazentrifugation

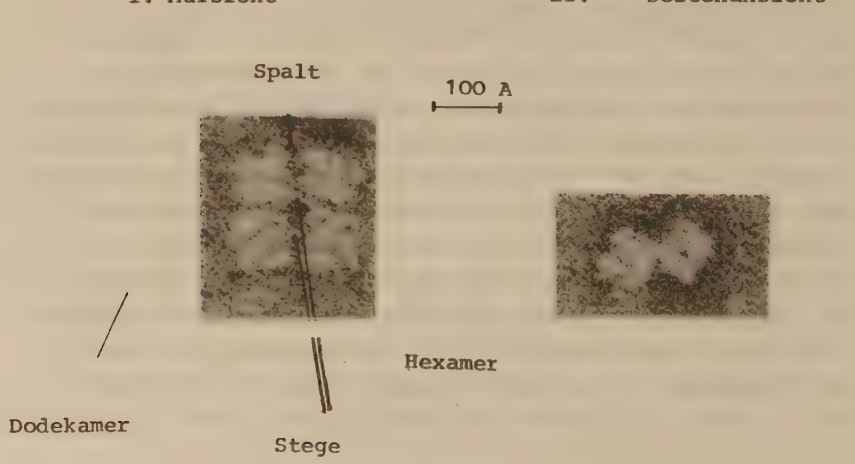
Wie in der DGC traten nur wenige Aggregate auf. Bedenken muß man dabei jedoch, daß man in der analytischen Ultrazentrifuge bei einer gegebenen Umdrehungszahl jeweils nur eine Größenordnung von Partikeln oder Molekülen gut analysieren kann, während in den anderen Größenordnungen nicht mehr so scharf unterschieden werden kann. Für diese ist ein entsprechend höhere oder niedrigere Umdrehungszahl zu wählen. Außerdem kann eine Bande oft mit verschiedenen Intermediaten korrespondieren, wobei eine fortwährende Dissoziation und Assoziation bis zum stabilen Endprodukt als Möglichkeit mit eingeschlossen werden muß (Bijlholt et al., 1979). Es wurden nur unkorrigierte Sedimentations-

konstanten berechnet, da die Korrekturfaktoren - neben der Extrapolation auf reines Wasser und Proteinkonzentration Null, dürfte vor allem die Gestalt eine entscheidende Rolle spielen - nur mit sehr großen experimentellem Aufwand hätten gewonnen werden können, aber keine wesentliche neue Aussage erbracht hätte. Zu den angegebenen S-Werten wird man in der Regel ca. 10% des unkorrigierten Wertes noch hinzurechnen müssen.

d) Zur Elektronenmikroskopie

Auf elektronenmikroskopischen Bildern stellt sich das 37 S-Hämocyanin als eine in einer Ebene liegende tetramere Anordnung von 4 kubischen Aggregaten (Hexameren, 16 S-Hämocyanin) dar (Abb. 11). Dabei sind zwei Hexamere sehr eng benachbart und bilden gemeinsam ein Halbmolekül (Dodekamer, 24 S-Hämocyanin). Die beiden Halbmoleküle sind dagegen durch einen 8 bis 12 A breiten Spalt getrennt, werden jedoch über zwei schmale Brücken miteinander verknüpft.

Abb.11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines 37 S-Hämocyanins



Während in der DGC und bei der analytischen Ultrazentrifugation in der Regel nur sehr wenige Flecken bzw. Banden zu sehen waren, zeigten die elektronenmikroskopischen Bilder eine große Variation an Reassoziationsprodukten. So ergab die Reassoziation von dissoziiertem 37-S Hämocyanin in der Ultrazentrifuge nur eine Bande und in der DGC einen einzigen Fleck, im Elektronenmikroskop konnte man - wenn auch meist nur in geringer Menge - alle denkbaren Intermediate erkennen. Die bei elektronenmikroskopischen Analysen oft gefundenen, von anderen Analysenmethoden abweichenden Ergebnisse könnten auf sekundären Veränderungen beruhen, wie z.B. Deformation oder Zerfall der Partikel bei Kontakt mit dem Trägerfilm. (Bijlholt et al., 1979). So erscheint es durchaus möglich, daß durch die Präparation (" spray droplet technique ") labile Aggregate auseinanderplatzen. Somit könnte die Methode in bescheidenem Maße sogar als Stabilitätskriterium dienen. Sehr selten vorkommende Aggregate konnten durch Verunreinigung durch eine zusätzliche Untereinheit erklärt werden.

e) Zur analytischen Plattengelelektrophorese

In viel stärkerem Maße als in der Elektronenmikroskopie scheinen hier destabilisierende Kräfte anzusetzen. Bei der Reassoziation von a + d + f + g + bc ließ sich in der DGC und in der analytischen Ultrazentrifuge 37 S-Hämocyanin nachweisen, während es in der PAGE und auch im Elektronenmikroskop nicht zu erkennen war; dafür traten niedrigere Aggregationsstufen auf. Oft waren keine ausgeprägten Banden, sondern eine starke Verschmierung zu erkennen, was eventuell auf einen Zerfall während des Laufs zurückzuführen war.

f) Zur zweidimensionalen Immunelektrophorese

Mit ihr konnte man die Reinheit des Ausgangsmaterials überprüfen. Weiterhin diente sie dazu, um in Reasso-

ziaten nach erneuter Dissoziation die Zusammensetzung aus verschiedenen Untereinheiten qualitativ und quantitativ zu ermitteln.

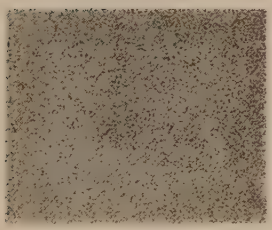
4.2. Hauptversuche

Die Ergebnisse aller Versuche, die hauptsächlich durch Dünnschichtgelchromatographie gewonnen und elektronenmikroskopisch bestätigt wurden, sind in Tab. 4 und 5 dargestellt. Sie kann man wie folgt zusammenfassen:

1) Keine Untereinheit reassoziiert bei dieser niedrigen Konzentration mit sich selber. Weder in der DGC noch elektronenmikroskopisch (Abb. 12) konnten Dimere beobachtet werden. Bei der analytischen Ultrazentrifugation war eine einheitliche Bande, die mit 4,8 S sedimentierte, zu sehen. Aus früheren Versuchen ist bekannt, daß f in geringen Mengen zu dimerisieren vermag (Schneider, 1978).
2) Ein Gemisch aus zwei Untereinheiten bildete niemals Hexamere. Allerdings wurden kleinere Aggregate gefunden; das Reassoziat aus a und bc (Abb. 13) wanderte in der DGC zwischen Dimeren und Hexameren, und sedimentierte mit 9,0 S, was einem Trimer entsprechen könnte.
Außerdem war eine starke Affinität zwischen g und f zu erkennen; in der DGC lieferten sie einen Fleck im Bereich von Dimeren, im Elektronenmikroskop waren jedoch auch Trimere zu erkennen.
3) Mindestens 3 Monomere sind nötig, um ein Hexamer zu bilden, jedoch vermögen es nicht alle Kombinationen. Die Kombination a + d + x (x = irgendeine andere Untereinheit) ergibt höchstens Trimere, jedoch in geringer Ausbeute. Untereinheit g scheint die Hexamerenbildung zu begünstigen. Hervorzuheben sind die Kombinationen a + f + g, die sich im Elektronenmikroskop als schöne Hexamere darstellen (Abb. 14) und mit 15,5 S sedimentieren; außerdem

Abb.12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von reassoziierten Hämocyaninpartikeln. Die Aufnahmen entstanden im Laboratorium von Prof. E.van Bruggen, Groningen. Die folgenden Photos (Abb.12-22) sind nicht von Originalabbildungen,sondern von Hochglanzabzügen gemacht worden, haben deshalb geringere Schärfe.
Primärvergrößerung: 60 000 x ;
Ein Balken entspricht 100±10 A.

Abb.12: Reassoziationsergebnis aus einzelnen Monomeren:
Die Reassoziation ist negativ



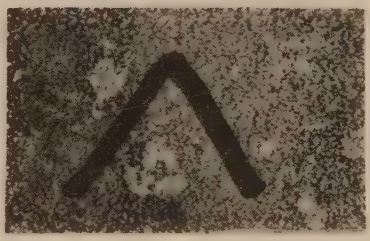
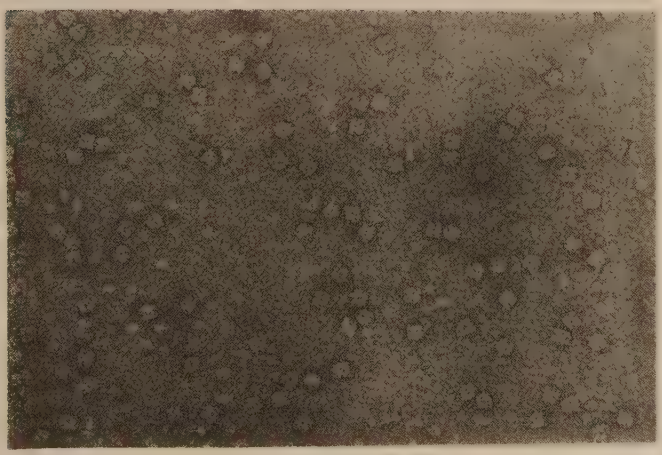


Abb.13 Reassoziiertes Trimer ausgehend von einem Untereinheitengemisch a+bc.

Abb.14:Reassoziierte Hexamere, ausgehend von dem Untereinheitengemisch a+f+g



Tab. 4: Mit der Dünnschichtgelelektrophorese gewonne Ergebnisse nach Reassoziation aller möglichen Kombinationen mit den einzelnen Untereinheiten.
(Sephadex G 200 sf, Laufzeit 8 h, 20°C).

Teil a: In Abwesenheit des Heterodimers bc

	0,00	88	<□	□	□□		
a	++	-	-	-	-	-	-
d	++	-	-	-	-	-	-
e	++	-	-	-	-	-	-
f	++	-	-	-	-	-	-
g	++	-	-	-	-	-	-
bc	++	-	-	-	-	-	-
a+d	++	-	o	-	-	-	-
a+e	++	-	o	-	-	-	-
a+f	++	-	o	-	-	-	-
a+g	++	-	-	-	-	-	-
d+e	++	-	-	-	-	-	-
d+f	++	o	-	-	-	-	-
d+g	++	-	-	-	-	-	-
e+f	++	-	-	-	-	-	-
e+g	++	-	-	-	-	-	-
f+g	+	-	-	o	-	-	-
a+d+e	+	-	-	-	-	-	-
a+d+f	+	+	+	-	-	-	-
a+d+g	+	-	-	-	-	-	-
a+e+f	+	+	+	-	-	-	-
a+e+g	+	-	o	+	-	-	-
a+f+g	+	-	-	++	-	-	-
d+e+f	+	-	-	+	-	-	-
d+e+g	++	-	-	o	-	-	-
d+f+g	++	-	-	o	-	-	-
e+f+g	+	-	-	+	-	-	-
a+d+e+f	+	-	-	++	-	-	-
a+d+e+g	+	-	-	+	-	-	-
a+e+f+g	+	-	-	++	-	-	-
a+d+f+g	+	-	-	+	-	-	-
d+e+f+g	+	-	-	+	-	-	-
a+d+e+f+g	o	-	-	++	-	-	-

Tab. 4: Teil b: In Anwesenheit des Heterodimers bc

	o,oo	8 < □	□	□□	⊞	⊞
bc+a	+	++ ↔ o	-	-	-	-
bc+d	++	- -	-	-	-	-
bc+e	++	- -	-	-	-	-
bc+f	++	- -	-	-	-	-
bc+g	++	- -	-	-	-	-
bc+bc	++	- -	-	-	-	-
bc+a+d	+	- +	-	-	-	-
bc+a+e	+	- +	-	-	-	-
bc+a+f	+	- +	-	-	-	-
bc+a+g	+	- ++	-	-	-	-
bc+d+e	++	- -	-	-	-	-
bc+d+f	++	- -	-	-	-	-
bc+d+g	++	- -	-	-	-	-
bc+e+f	++	- -	-	-	-	-
bc+e+g	++	- -	-	-	-	-
bc+f+g	++	- -	+	-	-	-
bc+a+d+e	++	- +	-	-	-	-
bc+a+d+f	++	- +	-	-	-	-
bc+a+d+g	+	- -	-	+	-	-
bc+a+e+f	+	- +	-	+	-	-
bc+a+e+g	+	- -	-	+	-	-
bc+a+f+g	+	- -	-	++	↔ ++	-
bc+d+e+f	++	- -	-	-	-	-
bc+d+e+g	++	- o	-	-	-	-
bc+d+f+g	++	- o	-	-	-	-
bc+e+f+g	+	- -	-	+	-	-
bc+a+d+e+f	o	- ++	-	-	-	-
bc+a+d+e+g	+	- -	-	+	-	-
bc+a+e+f+g	o	- -	-	-	++	-
bc+a+d+f+g	o	- -	-	-	-	++
bc+d+e+f+g	o	- +	-	-	-	-
bc+a+d+e+f+g	o	- -	-	-	-	++

++ 100 %
+ 50 %
o Spuren
- negativ

o Monomere
oo Dimere
8 Trimere

□ 1x6 Strukturen
□□ 2x6 "
⊞ 3x6 "
⊞ 4x6 "

Tab. 5: Mit dem Elektronenmikroskop gewonne Ergebnisse nach der Reassoziation aller möglichen Kombinationen mit den einzelnen Untereinheiten

Teil a : In Abwesenheit des Heterodimers bc

	o	oo	ooo	□	□□	⊞	⊞
a	++	-	-	-	-	-	-
d	++	-	-	-	-	-	-
e	++	-	-	-	-	-	-
f	++	-	-	-	-	-	-
g	++	-	-	-	-	-	-
bc	-	++	-	-	-	-	-
a+d	++	-	-	-	-	-	-
a+e	+	+	o	-	-	-	-
a+f	+	+	o	-	-	-	-
a+g	++	-	-	-	-	-	-
d+e	++	-	-	-	-	-	-
d+f	+	+	-	-	-	-	-
d+g	++	o	-	-	-	-	-
e+f	+	+	-	-	-	-	-
e+g	++	-	-	-	-	-	-
f+g	+	++	-	-	-	-	-
a+d+e	+	+	o	o	-	-	-
a+d+f	+	+	+	o	-	-	-
a+d+g	+	+	+	-	-	-	-
a+e+f	++	++	-	o	-	-	-
a+e+g	+	+	-	+	-	-	-
a+f+g	o	o	-	++	-	-	-
d+e+f	+	+	-	++	-	-	-
d+e+g	+	+	-	+	-	-	-
d+f+g	+	+	-	+	-	-	-
e+f+g	+	+	-	++	-	-	-
a+d+e+f	+	+	-	++	-	-	-
a+d+e+g	++	++	-	+	-	-	-
a+e+f+g	+	+	-	++	-	-	-
a+d+f+g	+	+	-	++	-	-	-
d+e+f+g	+	+	-	++	-	-	-
a+d+e+f+g	o	o	o	++	-	-	-
a+d+e+f+g+bl	+	+	-	++	-	-	-
a+d+e+f+g+cc	+	+	-	++	-	-	-

Tab. 5: Teil b: In Anwesenheit des Heterodimers bc

	o	oo	∴	□	□□	□□/□	⊞
bc+a	+	+	++	-	-	-	-
bc+d	++	++	-	-	-	-	-
bc+e	++	++	-	-	-	-	-
bc+f	++	++	-	-	-	-	-
bc+g	++	++	-	-	-	-	-
bc+bc	-	++	-	-	-	-	-
bc+a+d	+	+	+ ↔	+	-	-	-
bc+a+e	+	+	+	-	-	-	-
bc+a+f	+	+	+ ↔	+	-	-	-
bc+a+g	+	+	++ ↔	++	-	-	-
bc+d+e	+	+	+	-	-	-	-
bc+d+f	+	+	+	-	-	-	-
bc+d+g	+	+	+	-	-	-	-
bc+e+f	+	+	-	-	-	-	-
bc+e+g	+	+	+	-	-	-	-
bc+f+g	+	+	-	++	-	-	-
bc+a+d+e §	+	+	+ ↔	+	+	o	-
bc+a+d+f §	+	+	+	+	o	o	-
bc+a+d+g	+	+	+	+	+	o	-
bc+a+e+f	+	+	+	++	-	-	-
bc+a+e+g	+	+	+	+	+	o	-
bc+a+f+g	+	+	+	+	+	o	-
bc+d+e+f	+	+	+	++	-	-	-
bc+d+e+g	+	+	+	++	-	-	-
bc+d+f+g	+	+	+	++	-	-	-
bc+e+f+g	+	+	+	++	-	-	-
bc+a+d+e+f	+	+	+	+	+	-	-
bc+a+d+e+g	+	+	+	+	++	-	-
bc+a+e+f+g	+	+	+	++	o	+	-
bc+a+d+f+g	+	+	+	+	o	+	+
bc+d+e+f+g	+	+	+	++	-	-	-
bc+a+d+e+f+g	+	+	+	+	+	+	++

§ Die Untereinheit a war mit sehr wenig g verunreinigt.

++ 100 %
+ 50 %
o Spuren
- negativ

o, oo Monomere, Dimere
∴ Trimere

□ 1x6 Strukturen
□□ 2x6 "
□□/□ 3x6 "
⊞ 4x6 "

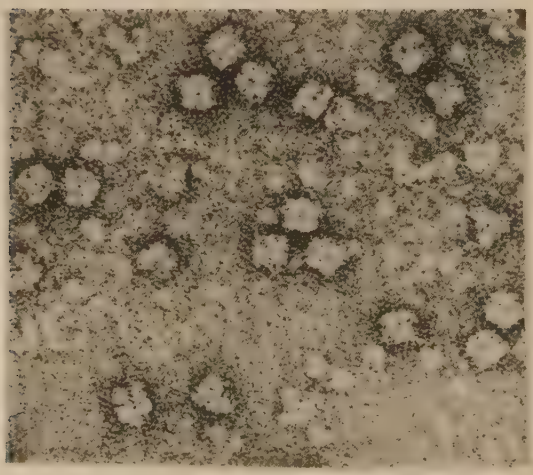
d + e + f, die als einzige Kombination ohne g Hexamere in hoher Ausbeute ergibt.

4) Mischt man 2 Monomere mit dem Heterodimer bc, so ergeben a + g + bc tetramere bis hexamere Strukturen (Abb. 15), die mit 12,7 S sedimentieren.
a + f + bc liefert ein Reassoziat, das im Elektronenmikroskop als Tetramer erscheint. Alle anderen Kombinationen ergeben kleinere, unregelmäßige Strukturen.

5) Gemische aus 4 oder allen 5 Monomeren ergeben in jedem Fall nur Hexamere (Abb. 16). Das Produkt aus a + d + e + f + g wurde in der analytischen Zentrifuge untersucht. Es sedimentiert mit 14,0 S.

Abb.15 Reassoziierte Tetramere, ausgehend von dem Untereinheitengemisch a+g+bc.

Abb.16: Reassoziierte Hexamere, ausgehend von dem Untereinheitengemisch a+d+e+f+g.



6) Reassoziiert man bc mit 3 Monomeren ohne a, so gewinnt man höchstens Hexamere. Daneben erkennt man im Elektronenmikroskop Strukturen geringerer Größe. Reassoziiert man jedoch a + g + bc + X (X = d,e oder f), bekommt man Strukturen, die größer sind als Hexamere. (Abb. 17). So sedimentiert das Produkt aus a + g + e + bc mit 21,2 S.

Interessant sind die Kombinationen, in denen g fehlt: Z.B. stellen sich Reassoziate von a + d + e + bc als eine Kette von aneinandergelagerten Würfeln dar (Abb.18), Reassoziate aus a + d + f + bc ergeben eine (3 x 6)-Struktur, wobei zwischen den 3 Würfeln keine "Brücke" ausgebildet wurde (Abb.19).

Abb.17:Reassoziierte Dodekamere, ausgehend von dem Untereinheitengemisch a+f+g+bc.

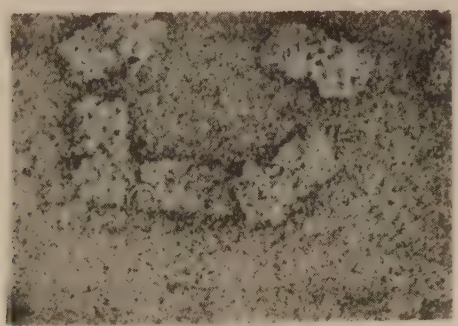
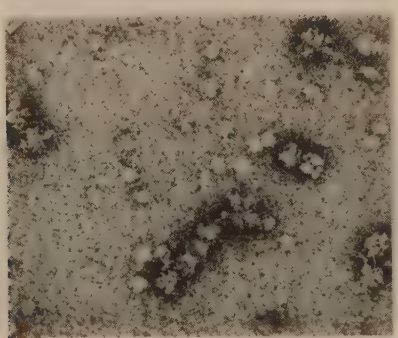


Abb.18:Reassoziierte Hexamere, die teilweise miteinander aggregiere ausgegangen wurde von dem Untereinheitengemisch a+d+e+bc.



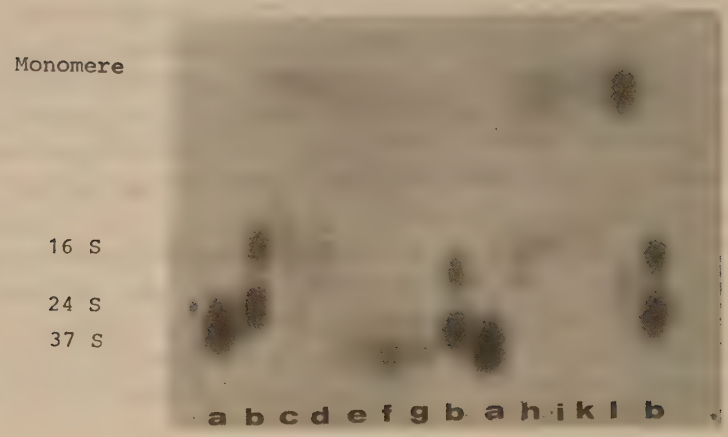


Abb.20: Dünnschichtgelchromatographie nach Reassoziation aus Gemischen isolierter Untereinheiten.
Sephadex G 200sf, Endkonzentration des Gemisches 2-3 mg/ml, aufgetragene Menge 20µl.

a = 37 S-Hämocyanin aus Eurypelma californicum
b = 24 S- und 16 S-Hämocyanin aus Cupiennius salei
c = Ausgangsgemisch: a+d+e+f (alle UE außer g und bc)
d = " a+d+e+f+bc (" g)
e = " a+d+e+g+bc (" f)
f = " a+d+f+g+bc (" e)
g = " a+e+f+g+bc (" d)
h = " a+d+e
i = " a+d+f
k = " a+e+f
l = " a+f+g

7) Um größere Strukturen als 24 S-Partikel zu erhalten, müssen mindestens a, f, g und bc gegenwärtig sein. In der DGC ergeben a + f + g + bc überwiegend Produkte, (Abb.20) die etwas schneller als 24 S-Hämocyanin wandern. (Da erst in Gegenwart von bc größere Strukturen als Hexamere gebildet werden und bc + a Trimere ergeben, ist zu schliessen, daß (bc + a) eine "linking unit" bildet). In der analytischen Ultrazentrifuge sedimentieren die Produkte mit 26,5 S.

Abb.19:Reassoziierte Hexamere,die teilweise miteinander aggregieren ohne den für das "intakte" 37 S-Hämocyanin typischen Spalt mit den Stegen auszubilden; ausgegangen wurde von dem Untereinheitengemisch a+d+f+bc.

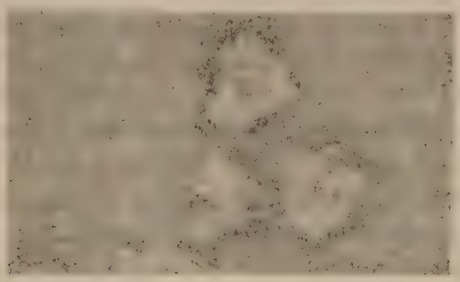


Abb.21: Reassoziiertes 28 S-Hämocyanin,ausgehend von dem Untereinheitengemisch a+e+f+g+bc. Deutlich sind die 1 oder 2 Untereinheiten zu erkennen,die in den noch nicht vollständigen Ouadranten hineinragen.

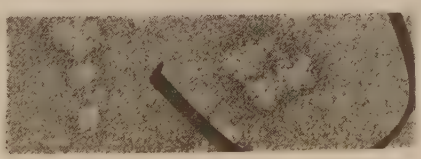


Abb.22: Reassoziierte 37 S-Hämocyanine, ausgehend von dem Untereinheitengemisch aus allen Untereinheiten.

8) Die Reassoziation eines Gemisches aus 4 Monomeren und bc ist gleichbedeutend mit dem Versuchsansatz aus allen Untereinheiten minus einer.
- fehlt a, so erhält man Strukturen in der Größenordnung von Hexameren;
- fehlt g, so gewinnt man überwiegend dodekamere Strukturen;
- fehlt f, erkennt man in der DGC und im Elektronenmikroskop dodekamere Assoziate, die jedoch mit 27,3 S sedimentieren;
- fehlt d, so läuft das Reassoziat in der DGC zwischen 24 S-Hämocyanin und 37 S-Hämocyanin; in elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man Gebilde, die wie " 3/4 - Hämocyanine " aussehen, also aus drei in einem rechten Winkel angeordneten Hexameren bestehen. An Stelle des 4. Hexamers befindet sich noch eine " knüppelhafte " Ausbuchtung (Abb.21). Diese Strukturen kommen sehr häufig vor. Die Partikel sedimentieren mit 28,7 S.
- fehlt e, so werden 37 S-Partikel gebildet. Jedoch scheinen diese nicht sehr stabil zu sein. Während sie in der DGC als sehr gut erkennbarer Fleck zu sehen sind, und mit 33,5 S sedimentieren, wandern sie in der PAGE nicht als einheitliche Bande, wie es ein Reassoziat aus allen Untereinheiten tut. Im Elektronenmikroskop sind alle Strukturen bis zu (4 x 6)-Partikeln hinzu sehen; letztere treten allerdings seltener in Erscheinung.
9) Alle Untereinheiten liefern stabile 37 S-Hämocyanine (Abb.22).

4.3.Einfluß der isolierten Komponenten b und c des Heterodimers bc auf die Reassoziation

Als nächstes wurde untersucht, welche Auswirkung die isolierten Untereinheiten b und c des sehr stabilen Heterodimers auf den Aggregationszustand haben. b und c lassen sich unter Einwirkung von 4 M Harnstoff über einen Ionenaustauscher trennen (Markl et al., 1979c). Sie aggregieren nach Harnstoffentzug sofort wieder zu Homodimeren bb, cc und zu dem Heterodimer bc. Kann man nun mit den Homodimeren auch höhere Aggregationsstufen als Hexamere erreichen? Dazu wurden verschiedene Versuche angesetzt (Tab. 6). b und c wurden einzeln und gemeinsam mit einem Monomerengemisch versetzt. Eine Versuchsreihe wurde in Gegenwart von 4 M Harnstoff durchgeführt, um sicher zu sein, daß die Monomeren nicht wieder aggregieren. In einer zweiten wurde der Harnstoff vorher wegdialysiert; dadurch sollte eine mögliche Schädigung der Monomeren verhindert werden. Das Ausmaß dieses vermuteten denaturierenden Effekts wurde nicht weiter untersucht. Wie mit den einzelnen Untereinheiten b und c wurde auch mit bc verfahren.
Das Ergebnis dieser Versuche war eindeutig:
Es entstand nur 37 S-Hämocyanin, wenn b und c als Heterodimer bc vorlagen.

Tabelle 6 : Einfluß von isoliertem b und c, auf das Reassoziationsvermögen. 0,1 M Tris/HCl pH 7,5; untersucht mit Dünnschichtgelchromatographie; Sephadex G 200 sf; Laufzeit 8 h.

Untereinheiten	4 M Harnstoff	maximale Reassoziationsstufe
Monomere	-	16 S Hc
Monomere	+	16 S Hc
Monomere + b§	-	16 S Hc
Monomere + b	+	16 S Hc
Monomere + c §	-	16 S Hc
Monomere + c	+	16 S Hc
Monomere + bc	-	37 S Hc ("sehr viel")
Monomere + bc	+	37 S Hc ("wenig")

§in Abwesenheit von Harnstoff dimerisieren b und c sofort zu bb und cc.

4.4. Regeln zur Reassoziation:

Obwohl gerade durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt wurde, daß die Reassoziationsprodukte eine sehr große Variationsbreite hinsichtlich Größe und Form einnehmen können, kann man besonders in der DGC erkennen, daß bei der Reassoziation ganz spezifische Aggregationsstufen bevorzugt entstehen: Hexamere, Dodekamere und größere Partikel; die zwischen diesen Stufen liegen. Aggregate sind vergleichsweise selten. Ordnet man die Daten nach diesem Gesichtspunkt (Tab. 7), so lassen sich daraus Regeln aufstellen, unter denen die einzelnen Aggregationshöhen erreicht werden:
Es gilt immer: X ≠ Y ≠ Z; (+ Z) bedeutet, daß Z nicht wirklich eingebaut ist: durch eine zusätzliche Untereinheit (Z), wird jedoch nicht eine noch höhere Assoziationsstufe erreicht.

Mit folgenden Kombinationen kommt man zu " Hexameren - Stufen ". (ca. 16 S).

a + X + Y (+Z)	X,Y = g,f,e	Z = g,f,e
g + X + Y (+Z)	X = f;Y = d,e	;Z = a
d + e + X (+Z)	X = g,f	Z = a,g,f
a + bc + X + Y	X,Y = d,e,f	
g + bc + X + Y		
d + e + bc + X	X = f,g	

zu " Dodekameren-Stufe " (ca. 24 S) :

bc + a + g + X (+Z)	X = d,e f	Z = Z = d,e,f Z = d,e
bc + a + g + f (+Z)		
bc + a + d + e + X	X = g,f	

zu Stufen (2 x 6)<-----<(4 x 6):

bc + a + g + f + X (+Z)	X = d,e	Z = d,e

zur (4 x 6) -Stufe:

bc + a + g + f + d (+Z)		Z = e

Tab. 7: Die Kombinationsmöglichkeiten mit isolierten Untereinheiten, um durch Reassoziation zu verschiedenen Aggregationsstufen zu kommen.

Aggregationsstufen	Mindestanzahl an verschiedenen Untereinheiten Monomere	bc	Untereinheiten a	d	e	f	g	bc
16 S	3	0	+	−	+	−	+	−
			+	−	−	+	+	−
			−	+	+	−	+	−
			−	+	−	+	+	−
			−	−	+	+	+	−
			−	+	+	+	−	−
	4	0	+	+	+	−	+	−
			+	+	−	+	+	−
			+	−	+	+	+	−
			+	+	+	+	−	−
			−	+	+	+	+	−
	5	0	+	+	+	+	+	−
	6 §	0	+	+	+	+	+	+
	3	1	+	+	+	−	−	+
			+	+	−	+	+	+
			+	−	+	+	+	+
			−	+	+	−	+	+
			−	+	−	+	+	+
			−	−	+	+	+	+
			−	+	+	+	−	+
	4	1	−	+	+	+	+	+
24 S	3	1	+	+	−	−	+	−
			+	−	+	−	+	+
			+	−	−	+	+	+
	4	1	+	+	+	−	+	+
			+	+	+	+	−	+
			−	−	+	+	+	+
deutlich größer als Dodekamere	4	1	+	+	−	+	+	+
			+	−	+	+	+	+
	5	1	+	+	+	+	+	+

§ das 6. Monomer ist die isolierte Untereinheit b bzw. c (wie unter Punkt C 4.3. beschrieben).

Tab.8:Die bei der Reassoziation notwendigen Untereinheiten, um eine bestimmte Aggregationshöhe zu erreichen.

Aggregationsstufe	notwendige Untereinheiten						variable Untereinheiten		
	a	d	e	f	g	bc	X	Y	Z
16 S	+	-	-	-	-	-	d,e,f,g	d,e,f,g	d,e,f,g
	-	-	-	+	+	-	d,e	-	a
	-	+	+	-	-	-	f,g	-	a,f,g
	+	-	-	-	-	+	d,e,f	d,e,f	-
	-	-	-	-	+	+	d,e,f	d,e,f	-
	-	+	+	-	-	+	f,g	-	-
24 S	+	-	-	-	+	+	d,e,f	-	d,e,f
	+	+	+	-	-	+	f,g	-	-
	-	-	-	+	+	+	a	-	d,e
24 S	+	-	-	+	+	+	d,e	-	d,e

Es gilt immer $X \neq Y \neq Z$!
Die Untereinheiten X und Y müssen neben den "notwendigen" Untereinheiten im Reassoziationsgemisch gegenwärig sein, um die gewünschte Aggregationshohe zu erreichen; die Gegenwart der Untereinheit Z hat keinerlei Einfluß.

Sehr klar kommt dabei heraus, daß man die Untereinheiten a oder g oder (d+e) benötigt, um überhaupt hexamere Strukturen aufbauen zu können. Diese Untereinheiten könnten mit Vorsicht als " strukturell - funktionell " äquivalent angesehen werden. Allerdings ist die " Affinität " dieser Untereinheiten zu den übrigen Untereinheiten unterschiedlich. Da a verglichen mit g ca 2o% mehr an unpolaren (Ala, Val, Ile, Leu) und ca 25 % mehr an basischen Aminosäuren (Lys, Arg, His), dafür aber nur etwa 60% des Gehaltes von g an Glycin und Prolin besitzt, ist eine unterschiedliche Oberflächenstruktur und sind damit unterschiedliche Kontaktmöglichkeiten sehr wahrscheinlich. Jedoch wird der Unterschied bei Anwesenheit von bc ausgeglichen, da a + bc und g + bc mit d, e oder f gleichartig reagieren. Werden Hexamere aus 4 verschiedenen Monomeren aufgebaut, so müssen auf jeden Fall a + g, a + f oder d + e + (a,g oder f) vertreten sein.
Um Dodekamere zu bekommen, muß man von der Kombination a + bc + (g oder d+e) ausgehen. Generell gibt es nur 4 verschiedene Möglichkeiten, um zu Dodekameren zu kommen (Tab. 8): (a + g + bc) scheint d und e in Abwesenheit von f in gleicher Weise einzubauen, allerdings sind die Strukturen hinsichtlich der Form sehr unterschiedlich Kommt f zu (a + g + bc) hinzu, gelangt man zu eindeutig höheren Aggregationsstufen als Dodekamere (Tab. 8).

Nur in Anwesenheit von allen Untereinheiten gewinnt man jedoch stabiles 37 S-Hämocyanin (4x6).

Man kann also zusammenfassen:

a)Für jede Aggregationsstufe muß eine bestimmte Anzahl an verschiedenen Untereinheiten vorhanden sein; für Hexamere braucht man mindestens 3, für Dodekamere 5 (b und c einzeln gerechnet), für größere Strukturen

6 und für ein stabiles 37 S-Hämocyanin 7 verschiedene Untereinheiten.

b) Um zu einer bestimmten Organisationshöhe zu gelangen, sind jeweils spezielle Untereinheiten nötig. Dabei kann man einzelnen Untereinheiten strukturelle Aufgaben zuschreiben;

1. a und bc sind für die Verknüpfung von 2 Hexameren verantwortlich;
2. g und f sind für die Verknüfung von 2 Dodekameren verantwortlich;
3. d und e haben keine deutlich erkennbaren Aufgaben; jedoch scheint man d für die Stabilisierung einer (3 x 6)-Struktur zu benötigen, und erst in Gegenwart von e erhält man stabiles 37 S-Hämocyanin, das dem nativen vergleichbar ist.

c) Die gelungene Aggregation zum 37 S-Hämocyanin muß zweifellos wohlgeordnet und in definierten Schritten verlaufen, da nicht jede Untereinheit mit jeder beliebigen aggregiert, sondern dies erst oft nach einer vermittelnden Zwischenaggregation mit einer dritten Untereinheit möglich wird. Bestimmt werden diese Unterschiede letztlich durch die unterschiedliche Primärstruktur; d und e scheinen dabei austauschbar zu sein.

Um die Austauschbarkeit der Untereinheiten und deren Auswirkung auf die Funktion besser beschreiben zu können, mußten Reassoziationsprodukte in präparativem Maßstab hergestellt werden, was in Anbetracht der sehr geringen Hämocyaninmengen große Probleme aufwarf. Deshalb wurden nur wenige, die wichtigsten, hergestellt. Oft war eine Wiederholung der Versuche nicht möglich.

5. Isolierung und Charakterisierung von Reassoziationsprodukten

Die wichtigsten Reassoziationsprodukte wurden mikropräparativ isoliert, um ihre Sedimentationskoeffizienten und ihre Zusammensetzung aus Untereinheiten qualitativ und quantitativ zu bestimmen.

5.1. Berechnung der Untereinheitenzusammensetzung von isolierten Reassoziationsprodukten

Dazu wurde jedes Reassoziationsprodukt dissoziiert und in der zweidimensionalen Immunelektrophorese untersucht. Außerdem wurde natives 37 S-Hämocyanin dissoziiert und parallel als Referenzprobe eingesetzt, um damit die Präzipitationsflächen zu standardisieren. Aus der Kenntnis der Zusammensetzung der Untereinheiten im nativen 37 S-Hämocyanin $\underline{a} + \underline{bc} + \underline{d} + \underline{e} + \underline{f} + \underline{g} = 4 + (2+2) + 4 + 4+ 4 + 4$ kann durch Division der Präzipitationsflächen einer speziellen Untereinheit mit der entsprechenden Anzahl der Untereinheiten (2 bzw. 4) die Größe der Präzipitationsfläche F_i berechnet werden, die einer Untereinheit entspricht. Durch Division der unbekannten Präzipitationsflächen mit dem entsprechenden F_i wurden die gesuchten Anzahlen der Untereinheiten ermittelt.

5.2.Versuchsdurchführung

Die Reassoziationsversuche wurden wie oben beschrieben durchgeführt, jedoch wurde von einer Gesamtmenge von 10 - 30 mg Hämocyanin ausgegangen. Die Endkonzentration betrug 2 - 5 mg/ml. Die Reassoziationsgemische wurden säulengelchromatographisch über Biogel A 1,5 m bzw. Biogel A 5 m (200-400 mesh) aufgetrennt. Die Säulendurchmesser betrugen 0,9 cm, die Säulenlängen 1,20 - 1,50 m. Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Untereinheitenzusammensetzung wurden die einzelnen Gipfel durch pH-Verschiebung auf 9,6 dissoziiert und dann durch

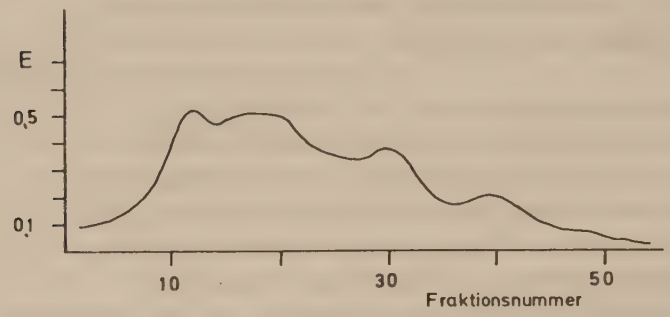
zweidimensionale Immunelektrophorese untersucht. Vom Gesamtreassoziat sowie von den isolierten Gipfelfraktionen wurden mit der analytischen Ultrazentrifuge die Sedimentationskoeffizienten bestimmt. Die Aufarbeitungen wurden teils bei 4°C teils bei 20°C durchgeführt, jedoch konnten keine Unterschiede im Ergebnis festgestellt werden.

Vorweg muß die Aussagekraft der quantitativen Analysen besprochen werden.

1) Bei der Berechnung der Anzahl der Untereinheiten muß man einen Fehler von ca. 5% ansetzten. Er trifft alle Untereinheiten in gleichem Maße. (Die Immungele wurden mit dissoziiertem 37 S-Hämocyanin, das bei jedem Lauf als Referenzprobe eingesetzt wurde standardisiert, und die Flächenverhältnisse entsprechend korrigiert.
2. Bei der Analyse der isolierten gelchromatographischen Fraktionen ist nicht auszuschließen, daß gleichzeitig mehrere Produkte mit etwas unterschiedlicher Zusammensetzung an Untereinheiten vorliegen. Dies könnte durch das fortwährende Dissoziations/Assoziationsgleichgewicht bedingt sein. Die Tatsache, daß bei der Angabe der Anzahl von Untereinheiten (Tab.9) meist keine ganzzahligen Verhältnisse auftreten, stellt einen Hinweis dafür dar.

Folgendes Beispiel soll einerseits Schwierigkeiten aufzeigen, andererseits demonstrieren, daß die Klarheit der Analysenergebnisse davon kaum beeinflußt wird : Die Trennung der Reassoziate aus einem Gemisch aller Untereinheiten, die in einem beliebigen Verhältnis vorlagen (wobei jedoch d und e durch Verunreinigung des Ausgangmaterials a + f + g + bc unterrepräsentiert waren) zeigt das Elutionsprofil der Abb.23. Die Fraktionen 10,12,17,20,23,30 wurden dissoziiert und in der zweidimensionalen Immungelelektrophorese untersucht. Die errechnete Anzahl der einzelnen Untereinheiten wird dazu aufgeführt. Aus den Sedimentationskoeffizienten lassen sich unter der berechtigten Annahme, daß

Abb.23: Profil der säulengelchromatographischen Isolierung der Reassoziationsprodukte aus dem Untereinheitengemisch: a+f+g+bc mit wenig d und e .
Die Endkonzentration betrug ca. 3 mg/ml. Biogel A 1,5 m; Säule: 0,9 x 160 cm; Durchflußgeschwindigkeit 3 ml/h.
Von einzelnen Fraktionen wurde die Zusammensetzung der Untereinheiten mittels zweidimensionaler Immunelektrophorese bestimmt. Außerdem wurden die Sedimentationskoeffizienten (unkorrigiert) einzelner Fraktionen ermittelt.



Untereinheiten	Fraktionsnummer 10	12	17	20	23	30
a	4,9	4,3	4,3	3,1	2,6	1,9
g	3,9	4,7	3,6	2,5	-	0,4
d	1,3	2,0	0,8	-	-	0,2
e	1,0	0,5	-	-	-	-
f	6,6	5,6	5,2	4,0	2,2	1,9
bc	4,0	4,0	4,0	4,0	2,0	-
	21,7	21,7	17,9	13,6	8,8	4,4
S-Wert unkorrigiert	-	32,3	26,5	23,9	-	7,4

es sich um globuläre Moleküle handelt, nach Elias (1969) die Molekulargewichte graphisch bestimmen. Größenordnungsmäßig stimmen diese mit denen gut überein, die sich aus der Gesamtzahl der im Reassoziat enthaltenen Untereinheiten errechnen lassen: Z.B. bauen 21 Untereinheiten ein Aggregat auf, das mit ca. 31 S sedimentiert.

5.3. Ergebnisse

Die Ergebnisse aller Versuche sind in Tab.9 zusammengestellt. Die Lage der isolierten Fraktionen kann man aus den entsprechenden Elutionsprofilen ersehen (Abb.24).

Alle Reassoziate lassen sich hinsichtlich ihrer Größe in 4 Gruppen I - IV einteilen:

Gruppe	Anzahl der Untereinheiten	Größenordnung des Aggregats
I	22 ± 2	(4x6) Aggregat
II	18 ± 1	(3x6) Aggregat
III	13 ± 1	(2x6) Aggregat
IV	7 ± 1	(1x6) Aggregat

In Anwesenheit von 5 mM Ca^{2+} wird 37 S-Hämocyanin aufgebaut, in dem das Verhältnis der Untereinheiten nur gering von a + bc + d + e + f + g = 4 + (2+2) + 4 + 4 + 4 + 4 abweicht. Die Abweichungen könnten einerseits durch Fehler bei der quantitativen Bestimmung der Untereinheiten, andererseits aber auch durch Fehlassoziation bzw. das Fehlen einer Untereinheit bedingt sein.
Wird die Reassoziation dagegen in Abwesenheit von Ca^{2+} durchgeführt, so bleibt das Verhältnis a + g + bc = 4 + 4 + (2+2) annähernd konstant, während das Verhältnis d + e + f starken Schwankungen unterworfen ist. Es ist jedoch deutlich zu erkennen, daß f quantitativ zunimmt, wenn e kaum oder gar nicht eingebaut worden ist; Untereinheit e tritt dann deutlich vermehrt auf, wenn g kaum oder gar nicht vertreten ist.
Überraschend ist die Möglichkeit zur Herstellung von Assoziaten mit ca. 8 Untereinheiten, die a, f, g, und bc

enthalten und zwar im Verhältnis a + f + g + bc = 2 + 1 + 1 + 1 + (2+2) (Tab.9,Nr.18-20). Zu bemerken ist hier, daß aufgrund der oben geschilderten Ergebnisse bei diesen Untereinheitenkombinationen größere Aggregate (Dodekamere) entstehen sollten.

Aus der Tabelle läßt sich ableiten, daß Aggregate mit eingebautem Heterodimer bc aus mindestens 7 Untereinheiten bestehen. Ist bc nicht vertreten so scheint die Position des Halb -Dimers im Hexamer von zusätzlicher d besetzt zu werden. Die Untereinheitenverteilung derartiger Hexamere ist in der Regel a + d + e + f + g = 1 + 2 + 1 + 1 + 1 (experimentell bestimmt: 1,4 + 1,9 + 1,4 + 1,5 + 1,0). Dabei scheint Ca^{2+} keinen Einfluß zu haben.

Fehlt neben bc auch e und d, so tritt vermehrt a auf.

Die schon unter Punkt C 4. geäußerte Annahme, daß bei der Reassoziation (d + e) und a austauschbar sind, kann hiermit gestützt werden (Tab.9,Nr.22-28).

Die Isolierung eines Hexamers aus a,f und g wie es unter Punkt C. 4. gefordert wurde, ist ebenfalls gelungen (Tab.9 Nr.28). Die Untereinheiten sind in etwa gleichen Verhältnissen vertreten: a + f + g = 1,8 + 1,6 + 1,9 (theoretische Zusammensetzung: 2 + 2 + 2.).

Die Unklarheit, ob die Kombination a + bc ein Trimer oder Tetramer bildet, konnte durch die Isolierung des Tetramers a + bc = 2 + 2 geklärt werden (Tab.9,Nr.30).

Zu bemerken ist, daß das Verhältnis a + bc = 2 + (1+1) in der Regel in allen **Reassoziaten** gewahrt bleibt (Ausnahmen stellen einige Hexamere dar).

Bemerkenswert ist aber auch die Isolierung eines Reassoziats mit der Zusammensetzung a + f + bc = 2,6 + 2,1 + 4,0 (Tab.9, Nr.17). Hier wird offensichtlich a teilweise durch f verdrängt.

Sehr gestützt wird durch die Versuche auch das Verhältnis f : g = 1 : 1 im nativen Hämocyanin. Es liegt in allen Reassoziaten vor, sieht man von einigen ab, die aus mehr als 18 Untereinheiten aufgebaut werden (Tab.9,Nr.1,2,5).

In diesen tritt f vermehrt auf, um, wie oben aufgeführt, die Positionen von e und d einzunehmen. Ein Reassoziat auf f + g (+ d + e) = 2,0 + 2,1 (+ 0,5 + 0,4) konnte isoliert werden (Tab.9,Nr.29 ; Abb.25).

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Die qualitativen Deutungen des vorherigen Kapitels konnten bestätigt und zum Teil quantitativ gefaßt werden.
2) Ein Gemisch aus allen Untereinheiten, auch in einem beliebigen Verhältnis zueinander, reassoziiert zu 37 S-Hämocyanin.
3) Mit Vorliebe werden Hexamere, Heptamere, Dodekamere, (3x6)- und (4x6)- Aggregate aufgebaut.
4) Auf der 37 S-Stufe entspricht die quantitative Untereinheitenzusammensetzung des Reassoziats nur in Gegenwart von Ca^{2+} der des undissoziierten 37 S-Hämocyanins.
5) Auch bei Abwesenheit von e wird 37 S-Hämocyanin gebildet.
6) Einzelne Untereinheiten können durch andere ersetzt werden: e durch f; bc durch d; (d+e) durch a.
7) Nur in Anwesenheit von f tritt bc doppelt auf.

Abb.25: Zweidimensionale Immunelektrophorese des säulengelchromatographisch isolierten Reassoziationsproduktes fg. Es wurde ein Antiserum gegen das gesamte Untereinheitengemisch verwendet. In der ersten Dimension war die Anode links. Man beachte, daß die Präzipitationslinien sich gegenseitig anheben, was als eine Bestätigung für das Vorliegen einer Assoziation angesehen werden kann.

Tab.9: Quantitative Verteilung der Untereinheiten in isolierten Reasoziaten
Reassoziationsbedingungen: 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5, T = 20°C, Endkonzentration des Proteingemisches 2-3 mg/ml; wenn nicht angegeben, wurde in Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} gearbeitet. Einige Elutionsprofile sind in Abb.24 zu finden.

Nr.	Nr. des Elutions-profils in Abb..24 /Fraktions Nr.	Ausgangsgemisch	Anzahl der Untereinheiten a	d	e	f	g	bc		S - Wert unkorrigiert
Gruppe I (4x6) :										
1.	—	a+d+f+g+bc(+e) § (willkürliches Verhältnis)	4,4	4,1	2,1	7,7	3,4	4,0	25,7	36,8
2.	IV/24	a+d+f+g+bc (alle ohne e)	4,2	2,8	-	9,5	3,8	3,7	24,0	35,0
3.	III/23	dissoziiertes 37 S-Hc (+55 mM Ca^{2+})	4,2	4,4	3,6	4,3	4,0	3,9	24,4	34,7
4.	—	dissoziiertes 37 S-Hc (+5 mM Ca^{2+})	3,1	2,6	4,0	5,1	3,3	4,0	22,1	34,1
5.	—	dissoziiertes 37 S-Hc (+5 mM Ca^{2+}) §§	3,6	3,8	5,1	1,5	4,4	4,4	22,7	34,3
6.	—	dissoziiertes 37 S-Hc (+5 mM Ca^{2+})	3,0	3,9	3,2	4,6	4,0	4,3	23,0	-
7.	—	dissoziiertes 37 S-Hc (ohne Ca^{2+})	4,3	4,3	3,9	2,0	4,1	4,2	22,8	35,1

In diesen tritt f vermehrt auf, um,wie oben aufgeführt, die Positionen von e und d einzunehmen. Ein Reassoziat auf f + g (+ d + e) = 2,0 + 2,1 (+ 0,5 + 0,4) konnte isoliert werden (Tab.9,Nr.29 ; Abb.25).

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Die qualitativen Deutungen des vorherigen Kapitels konnten bestätigt und zum Teil quantitativ gefaßt werden.
2) Ein Gemisch aus allen Untereinheiten, auch in einem beliebigen Verhältnis zueinander, reassoziiert zu 37 S-Hämocyanin.
3) Mit Vorliebe werden Hexamere, Heptamere, Dodekamere, (3x6)- und (4x6)- Aggregate aufgebaut.
4) Auf der 37 S-Stufe entspricht die quantitative Untereinheitenzusammensetzung des Reassoziats nur in Gegenwart von Ca^{2+} der des undissoziierten 37 S-Hämocyanins.
5) Auch bei Abwesenheit von e wird 37 S-Hämocyanin gebildet.
6) Einzelne Untereinheiten können durch andere ersetzt werden: e durch f; bc durch d; (d+e) durch a.
7) Nur in Anwesenheit von f tritt bc doppelt auf.

Abb.25: Zweidimensionale Immunelektrophorese des säulengelchromatographisch isolierten Reassoziationsproduktes fg. Es wurde ein Antiserum gegen das gesamte Untereinheitengemisch verwendet. In der ersten Dimension war die Anode links. Man beachte, daß die Präzipitationslinien sich gegenseitig anheben, was als eine Bestätigung für das Vorliegen einer Assoziation angesehen werden kann.

Nr.	Nr. des Elutions-profils	Ausgangsgemisch	Anzahl der Untereinheiten							S - Wert unkorrigiert
			a	d	e	f	g	bc		
18.	——	a+f+g+bc	2,3	-	-	1,0	0,9	4,0	8,2	-
19.	——	a+bc(+f+g) §	2,3	-	-	1,0	0,7	4,0	8,0	13,7
2o.	——	a+bc(+f+g) §	2,2	-	-	0,8	0,5	4,0	7,5	-
21.	VIII/44	a+d+e+f+bc (alle ohne g)	3,2	0,8	1,4	0,4	-	2,0	7,8	-
22.	——	dissoziiertes 37 S-Hc (+5 mM Ca^{2+})	1,6	1,3	1,4	1,3	1,4	0,8	7,8	-
23.	——	dissoziiertes 37 S-Hc (+5 mM Ca^{2+})	1,4	2,1	1,5	1,4	1,0	-	7,4	15,2
24.	III/33	dissoziiertes 37 S-Hc (+5 mM Ca^{2+}) §§§	0,8	2,0	1,0	1,4	0,7	0,4	6,3	15,1
25.	——	a+d+f+g+bc(+e) §	1,5	0,3	0,3	2,3	1,5	0,6	6,5	-
26.	IV/35	a+d+f+g+bc (alle ohne e)	3,5	0,4	-	2,0	1,7	-	7,6	17,0
27.	VI/38	a+d+e+f+g (alle ohne bc)	1,4	1,7	1,3	1,6	1,0	-	7,0	14,4
28.	II/48	a+f+g(+d+e+bc) §	2,4	-	-	2,4	2,0	-	6,8	15,5

Nr.	Nr. des Elutions-profils	Ausgangsgemisch	Anzahl der Untereinheiten a	d	e	f	g	bc		S - Wert unkorrigiert
29.	V/45	f+g+(+a+d)§	0,5	-	0,4	2,0	2,1	-	5,0	13,7
30.	——	a+bc(+d)§	2,1	0,2	-	-	-	2,0	4,3	9,1
31.	Abb.23/30	a+f+g+bc(+d+e)§	1,9	0,2	-	1,9	0,4	-	4,4	7,4

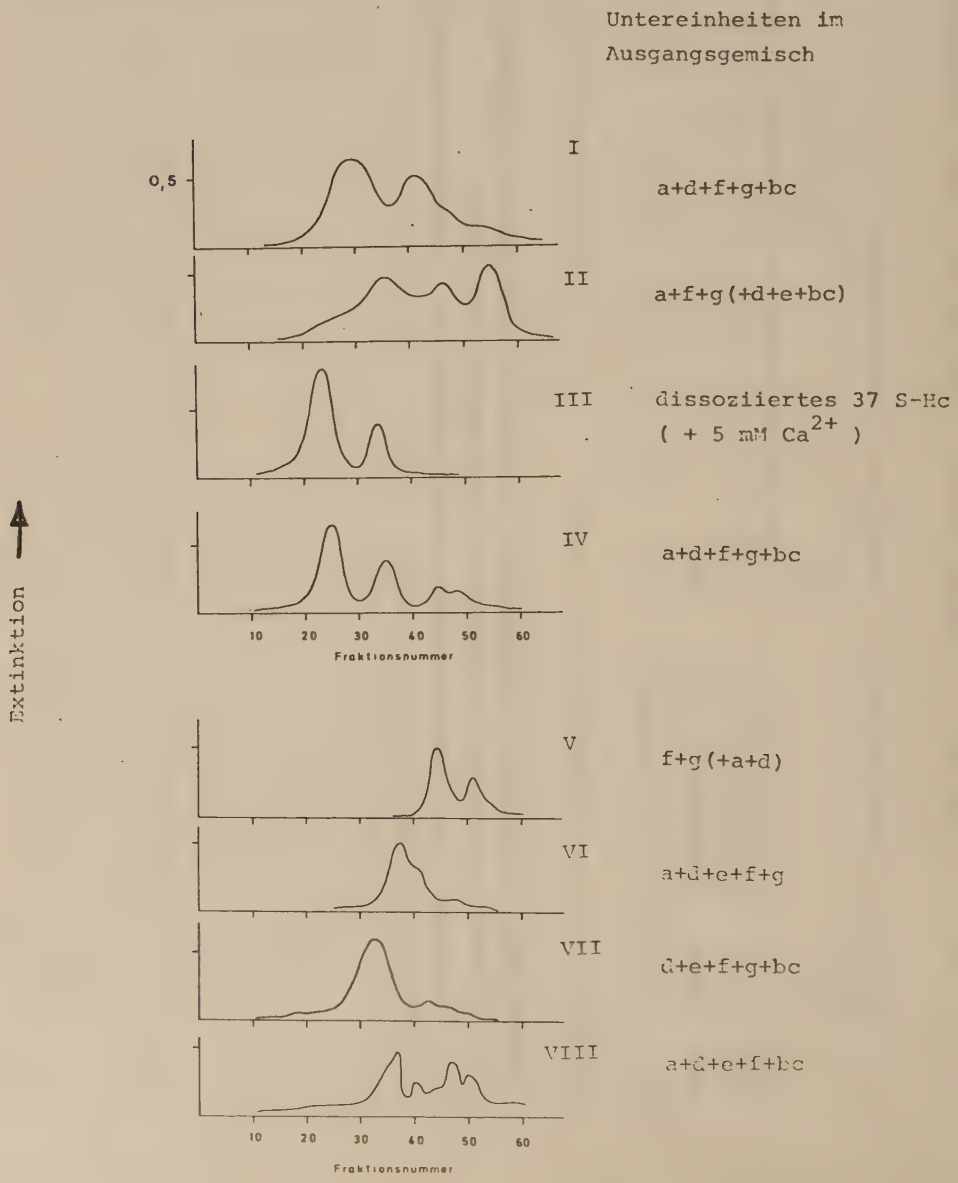
Die Gruppenbezeichnungen I,II,III,IV beziehen sich auf die Definition von Seite

§ ( ) bedeutet, daß die Untereinheiten unterrepräsentiert waren.

§§ Das native 37 S-Hämocyanin wurde mittels präparativer Ultrazentrifugation gewonnen

§§§ Es wird kein Elutionsprofil gezeigt

Abb.24: Trennprofile einiger Reassoziationsprodukte, wie sie in Tab.9 aufgeführt sind.
Säulengelchromatographie: Biogel A 1,5 m, Säule 0,9 x 140 cm, Elutionsgeschwindigkeit 3-4 ml/h



6. Qualitativer Vergleich von Reassoziation und Dissoziation in der Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) und im Elektronenmikroskop

Die Beantwortung einer wichtigen Frage blieb bis jetzt offen: Ist das 37 S-Reassoziat überhaupt identisch mit dem nativen Hämocyanin? Es könnten ja auch 37 S-Reassoziate entstehen, in denen die Anordnung - also die "räumliche Nachbarschaft" - anders als im nativen Molekül ist. Die Beantwortung dieser Frage wurde indirekt angegangen, da direkte Methoden, wie z.B. die immunelektronenmikroskopische Technik, im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen, noch Aggregate nach Andissoziieren von 37 S-Hämocyanin säulengelchromatographisch oder mittels präparativer Gelelektrophorese gewonnen werden konnten. Es war deshalb nur ein qualitativer Vergleich von Reassoziations- und Dissoziationsprodukten in der PAGE und im Elektronenmikroskop möglich. Dazu war es notwendig, die Dissoziation genauer zu untersuchen.

6.1. Die Beschreibung des Gelmusters nach Andissoziieren des 37 S-Hämocyanins.

Dissoziiert man 37 S-Hämocyanin durch Zugabe von 0,05 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,6 an (3-18 h), und analysiert die Proben mittels PAGE in kürzeren Abständen, so fallen neben den Banden der monomeren bzw. dimeren Untereinheiten, welche am weitesten wandern, noch bis zu 5 Banden auf, welche zwischen diesen und dem undissoziierten Hämocyanin liegen (Abb.26). Beim Vergleich mit den Referenzen, dem 24 S-und 16 S-Hämocyanin aus Cupiennius salei, laufen zwei Banden langsamer als 24 S-Hämocyanin, Bande (I) nur etwas schneller als das 37 S-Hämocyanin, die Bande (II) nur etwas langsamer als das 24 S-Hämocyanin. Letztere ist jedoch etwas diffus. Auffallend ist, daß bei den meisten

Versuchen an der Stelle des erwarteten 24 S-Hämocyanins - entsprechend einer Halbierung des Moleküls - nur eine äußerst schwache Bande auftrat. Eine Bande (III), die etwas schneller als 24 S-Hämocyanin ist, ist nur schwach ausgeprägt. Sehr deutlich ist auch eine Bande (IV) zu beobachten, die etwas langsamer läuft als 16 S-Hämocyanin. In sehr wenigen Versuchen tritt sie als Doppelbande auf (IV_a,IV_b). Erneut ist auffallend, daß keine Bande in der Position des 16 S-Hämocyanins läuft. Nach längerem Stehenlassen entsprechend behandelter Proben tritt dort allerdings eine Bande (V) auf.Des öfteren deuten sich weitere Banden im Bereich zwischen den 16 S-Hämocyanin-Positionen und dem Bereich der Untereinheiten an.

Bande I: Sie wurde schon von Schmid (1976) beobachtet. Sie erscheint bei längerem Aufbewahren von 37 S-Hämocyanin in der Kälte wie auch in neutralen Lösungsmitteln. Savel (1979) beobachtete eine signifikante Zunahme dieser Bande bei Inkubation von 37 S-Hämocyanin in Saccharose. Der Vorgang erschien reversibel. Die durch Ausschneiden und nachfolgende Elution aus dem Gel gewonnene Bande sedimen-

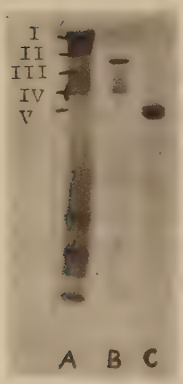


Abb.26: Bandenmuster von nativem 37 S-Hc, und 24 S-Hämocyanin nach 3 h Dialyse gegen Glycin/NaOH-Puffer, I=0,05, pH 9,6 linearer Arylamidgradient: 5-15 %
A=37 S-Hämocyanin aus Eurypelma californicum
B=24 S-Hämocyanin aus Cupiennius salei
C=16 S-Hämocyanin und 16 S-Begleitprotein aus Cupiennius salei

tierte in der anlytischen Ultrazentrifuge mi ca. 28-30 S. Auf Aufgrund der Molekulargewichtsbestimmung nach Herick and Smith (1968) hat dieses Assoziat ca. 19 - 20 Untereinheiten. Dies entspricht einer (3x6)-Struktur mit einer oder zwei zusätzlichen Untereinheiten, wie sie auch auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu sehen ist (s. u.).

Bande II: Sie wird im Zusammenhang mit dem quervernetzten 37 S-Hämocyanin näher beschrieben. Sie sedimentiert mit ca. 26 S. Es scheint sich um eine (2x6)-Struktur zu handeln, der noch mindestens 2 weitere Untereinheiten zusätzlich anhängen.

Bande III: Sie ist nur sehr schwach zu erkennen (s.o.).

Bande IV: Wie wird durch Vergleich mit einer analogen Bande bei Cupiennius salei (Markl, 1980) als ein 18 S-Hämocyanin erkannt. Dissoziiert man 24 S-Hämocyanin von Cupiennius salei eine kurze Zeit - 3 h - in 0,05 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, so erscheint eine sehr kräftige Bande zwischen 24 S- und 16 S-Hämocyanin, die mit 18 S sedimentiert. Mit Hilfe der oben erwähnten Molekulargewichtsbestimmung errechnet Markl (1980) 7 Untereinheiten.
Die Aufspaltung dieser Bande (IV_a und IV_b) könnte mit dem Auftreten von 2 Aggregaten mit 7 bzw. 8 Untereinheiten erklärt werden.
Die Banden zwischen 16 S-Hämocyanin und den dimeren bzw. monomeren Untereinheiten können durch Vergleich mit quervernetzten Dissoziationsprodukten als Trimere, Tetramere und Pentamere angesprochen werden (s.u.).

6.2.Beschreibung des Gelmusters nach der Reassoziation aus einem Untereinheitengemisch.

Reassoziiert man wie früher beschrieben das Untereinheitengemisch aus 37 S-Hämocyanin in 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0 in Gegenwart von 5 mM Ca^{2+} (oder bei pH 7,5 ohne Ca^{2+}), findet man in der PAGE Banden in den Positionen von 16 S-, 18 S-, 24 S-, 28 S-und 37 S-Hämocyanin.

Beim Vergleich des Gelmusters nach Reassoziation mit dem nach der Dissoziation lassen sich folgende Feststellungen machen:

a) Ausgeprägte Banden in der Position von 18 S, 28 S, und 37 S treten sowohl während der Reassoziation als auch Dissoziation auf.

b) Nur bei der Reassoziation treten Banden in den Positionen von 16 S-und 24 S-Hämocyanin kräftig in Erscheinung. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß ein 16 S-Produkt schon unter Punkt C.2.beschrieben wurde; es stellt ein Fehlassoziat dar, in welchem die Untereinheiten bc nicht enthalten sind, also eine Sackgasse des Reassoziationsvorganges darstellt.

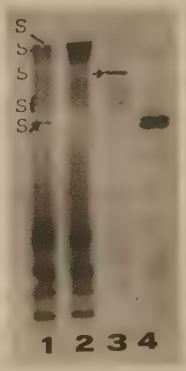


Abb.27: Bandenmuster von reassoziiertem 37 S-Hämocyanin nach 3 h Dialyse gegen Glycin/NaOH-Puffer, I=0,05, pH 9,6; Linearer Acrylamidgradient: 5-15 %
1=Gesamtreassoziat aus dissoziiertem nativen 37 S-Hämocyanin aus Eurypelma californicum
5 mM Ca^{2+} war während der Reassoziation anwesend (vgl. Abb. 7)
2=säulengelchromatographisch isoliertes 37 S-Hc (vgl. Abb. 7).
3=24 S-Hämocyanin aus Cupiennius salei
4=16 S-Hämocyanin und 16 S-Begleitprotein aus Cupiennius salei.

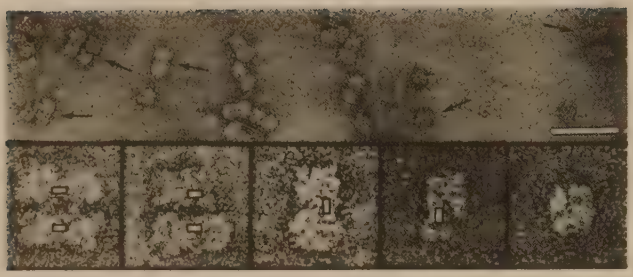
Man kann annehmen, daß 2 Molekülkomplexe räumlich identisch sind, wenn sich ihre Zerfallsmuster gleichen, d.h. der gleiche Zerfallsweg vorliegt. Das Gelmuster nach Andissoziieren von isolierten 37 S-Reassoziationsprodukten ist dem nach Andissoziieren von nativem 37 S-Hämocyanin identisch (Abb.27). Diese Beobachtung stärkt folgende Annahme:

Ein reassoziiertes 37 S-Hämocyanin ist tatsächlich wie das native aufgebaut , besitzt also die gleiche Quartärstruktur wie ein natives 37 S-Hämocyanin ; d.h. aber wiederum, daß die Reassoziation wohl geordnet und gerichtet verläuft (und außer zu 16 S- und 24 S-Strukturen zu keinen weiteren nennenswerten Aggregaten führt).

6.3. Vergleich von Reassoziations- und Dissoziationsprodukten in elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Während man in der Polyacrylamidelektrophorese Molekülgröße und elektrophoretische Beweglichkeit vergleichen kann, kann man im Elektronenmikroskop vor allem die Form studieren. Eine starke Stütze dafür, daß sich die Reassoziation über die gleichen Aggregationsstufen vollzieht, wie die Dissoziation, liegt dann vor, wenn Reassoziations- und Dissoziationsprodukte gleiche Gestalt haben. Dies trifft nach meinen Ergebnissen zu. Abb.28 zeigt 37 S-Hämocyanin nach einstündiger Dissoziation in Glycin/NaOH-Puffer pH 9,6. Die durch Reassoziation gewonnenen Aggregate (siehe Punkt C.4 und C.5) sind den Dissoziationsprodukten äußerst ähnlich. Dies trifft im Besonderen für die 16 S-18 S-, 24 S-, 28 S- und 37 S-Hämocyanine zu. Die ein bzw. zwei Untereinheiten, die beim (3x6)-Aggregat in den freien Quadranten hineinragen, sind sowohl bei der Reassoziation wie auch bei der Dissoziation deutlich zu erkennen (vergleiche dazu auch Abb.21).

Versuche, die Aggregate nach Andissoziieren von 37 S-Hämocyanin säulengelchromatographisch zu trennen, oder sie mit der präparativen Gelelektrophorese zu gewinnen, waren erfolglos.



35S 30S 24S 18S 16S

Abb. 28 :

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 37 S-Hämocyanin nach 3 h Dialyse gegen Glycin/NaOH (pH = 9,6; I = 0,05). Es w rden die verschiedenen Dissoziationsprodukte gezeigt: 16 S (a); 18 S (b); 24 S (c); 30 S (d); 37 S (e); (s.a. Markl et al.,1981b). Die kleinen Balken stellen die wahrscheinliche Position des Heterodimers bc dar. Der große Balken stellt eine Länge von 50 nm dar. Die Primärvergrößerung betrug 60 000 x .

7. Bruchstücke des 37 S-Hämocyanins nach Quervernetzung mit bifunktionellen Imidaten.

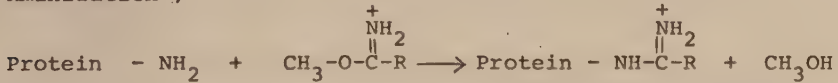
Um Aggregate mit der nativen Anordnung der Untereinheiten in stabilisierter Form zu erhalten, wurde mit bifunktionellen Imidaten das undissoziierte 37 S Hämocyanin quervernetzt und dann dissoziiert. Bei der Auswahl der Quervernetzungsreagenzien (" cross - linking " - Reagenzien) muß die Struktur des 37 S-Hämocyanins berücksichtigt werden.

Zum Einsatz kamen 5 Reagenzien: Dimethylsuberimidat (DSI), Dimethyl-3,3-dithiobispropionimidat (DTBP), Methyl--4-Mercaptobutyrimidat (MMB), und Dithiobis (succinimidyl-) propionat (DTSP). Über Struktur, Länge und entsprechende Referenzen gibt Tab.1 Auskunft.

Die Imidate DSI, DTBP und MMB reagieren hochspezifisch mit Aminogruppen (Abb.29). Der N-Hydroxysuccinimidatester DTSP reagiert außerdem mit der Imidazol-Gruppe des Histidins und der Sulfhydryl-Gruppe des Cysteins.

Abb.29:

Reaktion von Imidaten mit den Aminogruppen von Proteinen (Aminidation)



Reaktion von N-Hydroxysuccinimidestern mit den Aminogruppen von Proteinen (nach Ji, 1979)

7.1. Vorversuche: Einfluß von Pufferspezies, Temperatur und Konzentration auf die " Vernetzungs "-Reaktion

Da die Reagenzien mit den α- Amino-Gruppen des Tris/HCl Puffers und den α- Amino-Gruppen des Glycin/NaOH Puffers, welche bisher in den meisten Versuchen verwandt wurden, ebenfalls reagieren, mußte ein neues Puffersystem gesucht werden. Als sehr geeignet erwies sich der für " cross-linking " Reaktionen häufig angewendete 0,1 M Triäthanol-amin (TEA/HCl Puffer mit pH 7,5 - 8,5. 37 S-Hämocyanin blieb in diesem Puffer bei pH 8,0 in der PAGE stabil. Die Reagenzien haben in wässriger Lösung keine hohe Lebensdauer (6 - 24 h bei entsprechenden Bedingungen). Als günstig erwies sich, sie in 1 M TEA/HCl Puffer, pH 8,0 - 8,5 zu lösen. Die genauen Versuchsbedingungen sind im Abschnitt Material und Methoden und in den Legenden zu den Abbildungen aufgeführt.

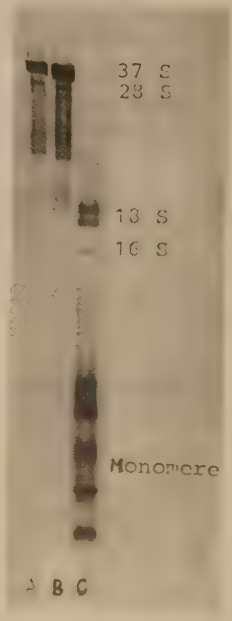


Abb.30: Quervernetzung des 37 S- Hämocyanins mit Dimethylsuberimidat (DSI)
100 µl Hc (c_{Hc} = 5 mg/ml) in 0,1 M TEA/HCl pH 8,0 wurden mit 10 µl DSI (c_{DSI} = 50 mg/ml) in 1 M TEA/HCl gelöst) (-A-), 5 µl DSI (-B-) und 2 µl DSI (-C-) 2 h bei 30°C quervernetzt. Die Reaktion wurde mit Lysin gestoppt. Über Nacht wurde in 0,05 M Glycin/NaOH pH 9,6 dissoziiert und dann jeweils 20 µl auf die PAGE (linearer Gradient: 5-15%) aufgetragen.

Die günstigste Reaktionstemperatur war 30°C. Bei höheren Temperaturen war in der PAGE eine Schädigung des 37 S-Hämocyanins zu beobachten; Bei niedrigeren Temperaturen war die Quervernetzung unvollständig oder fand nicht statt.
Die Variation des Verhältnisses Protein : Reagenz ergab, daß 37 S-Hämocyanin nahezu vollständig quervernetzt war, wenn das Verhältnis 1:1 betrug (Abb.30); wurde es zu Gunsten des Proteins erhöht, so traten in der PAGE mehrere neue Banden zwischen dem 37 S-Hämocyanin und den Monomeren hinzu, d.h. das Gesamtmolekül wurde nicht mehr quantitativ quervernetzt (Abb.30). Veränderte man das Verhältnis zu Gunsten der Reagenz, so war in der PAGE ein hoher Anteil an größeren Aggregationsstufen als 37 S zu erkennen; es findet also eine intermolekulare Quervernetzung statt (Abb.31).

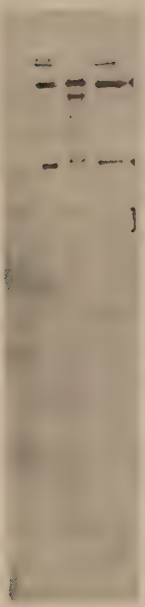


Abb.31:Quervernetzung des 37 S-Hämocyanins mit Dimethylsuberimidat DSI - Variation der Konzentrationen: Protein : DSI :

100 µl Hc (c = 1,8 mg/ml) in 0,1 M TEA/HCl pH 8,0 wurden mit 25 µl DSI (c = 10 mg/ml in 1 M TEA/HCl pH 8,0) -A-, 5 µl DSI -B-, und 50 µl DSI -C-, 2 h bei 30°C quervernetzt. Weitere Behandlung siehe Abb. 3.

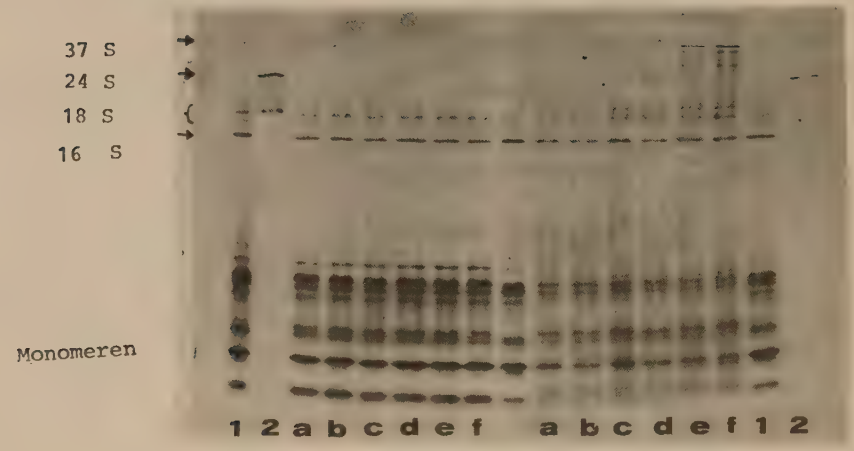
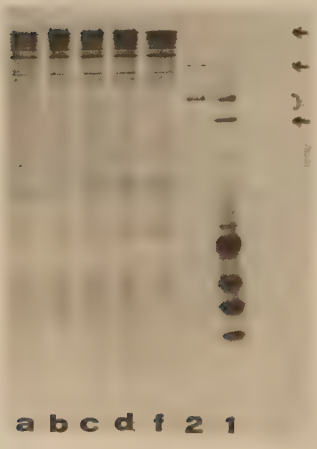


Abb.32:Quervernetzung von 37 S-Hämocyanin mit DSI (Dimethylsuberimidat) - A -, DTBP (Dimethyl-3,3-dithiobispropionat) - B - und DTSP (Dithiobis (Succinimidyl Propionat) - C - in Abhängigkeit von der Reaktionszeit.
Reaktionsbedingungen: c_{Hc} = 5 mg/ml in 0,1 M TEA/HCl,pH 8,0 $c_{Reagenz}$ = 10 mg/ml in 0,1 M TEA/HCl,pH 8,0; Reaktionsvolumen 1 ml Hc + 10 µl Reagenz; T = 30,0°C; die Reaktion wurde mit Lysin abgestoppt; über Nacht wurde in 0,05 M Glycin/NaOH pH 9,6 dissoziiert und dann jeweils 20 µl auf die PAGE (linearer Gradient: 5-15%) aufgetragen.

Reaktionszeiten:
a = 5 Minuten
b = 10 "
c = 15 "
d = 30 "
e = 60 "
f = 120 "



1 = 37 S-Hc von Eurypelma californicum
2 = 24 S-Hc von Cupiennius salei

Die Proben 1 und 2 waren vor dem Auftragen 3 h gegen pH 9,6 dialysiert worden.

Monomeren

Für die spätere Aufarbeitung der Ansätze erschien es günstig, kleine Volumina, d.h. hohe Proteinkonzentration zum Auftragen auf die Säule zu haben. Deshalb wurden weitere Versuche mit einer Konzentration zwischen 1,5 - 5 mg/ml durchgeführt.
Bei dem Verhältnis Protein : Reagenz wie 5:1 traten neben sehr wenig 37 S, vor allem Banden im 24 S-, 18 S-, 16 S- und in niedrigeren S-Bereichen auf (Abb.30). Da diese Banden von Interesse waren, wurde weiterhin im Verhältnis Protein :Reagenz wie 5:1 (w/w) quervernetzt. Stoppt man die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten wie z.B. 5,10,15,30,60,120 Min. so ist eine sehr schwache Zunahme an höheren quervernetzten Stufen festzustellen (Abb.32). Im Folgenden betrug die Reaktionsdauer 2 h.

7.2. Vergleich der elektrophoretischen Banden-Muster nach Quervernetzung (Abb.33):

Durch Quervernetzung mit DSI, DTBP und MMB wurden im Bereich zwischen dem 37 S- und 24 S-Hämocyanin drei Banden (B,C,D) fixiert, die während der Dissoziation bzw. Reassoziation immer wieder erschienen. Bande B entspricht dem 28 S Hämocyanin. Im Gegensatz zu DSI und DTBP gewinnt man mit MMB eine große Menge an 24 S-Hämocyanin (Bande E).
Im 18 S-Bereich lassen sich mit MMB zwei Banden (H und I) nachweisen. Nach Behandlung mit DSI und DTBP tritt noch eine Bande (K) hinzu. Aus der Molekulargewichtsbestimmung (s.u.) läßt sich schließen, daß sich die Banden H und I aus 8 bzw. 7 Untereinheiten zusammensetzen. Bande K muß man auch 7 Untereinheiten zuschreiben, da sie nur geringfügig schneller als Bande I, aber deutlich langsamer als Bande L läuft.
Bande L, die man durch den Einsatz von DTBP und DSI gewinnt, läuft auf der Höhe von 16 S-Hämocyanin und wird

aus 6 Untereinheiten aufgebaut. Beim Einsatz von MMP läßt sich ein Hexamer nicht fixieren.
Im 16 S - 24 S-Bereich gewinnt man mit DSI, nicht aber mit den anderen Reagenzien, noch zwei Banden (F,G). Beim Einsatz von MMB treten sie nur sehr schwach ausgeprägt auf, mit DTBP erhält man überhaupt nur die Bande G, und diese nur sehr schwach. Interessant ist dabei das Auftreten der entsprechenden Bande G im Dissoziations-/Assoziationsmuster von 37 S-Hämocyanin.
Während mit DSI im Bereich zwischen Hexameren und Monomeren kein Aggregat in nennenswerter Ausbeute entstand, lassen sich mit DTBP und MMB bis zu 3 zusätzliche Banden (M,N,O) gewinnen. Sie entsprechen nach der Molekulargewichtsbestimmung Trimeren (O), Tetrameren (N) und Pentameren (M). Es sind Aggregate, die beim Andissoziieren des nativen 37 S-Hämocyanins nur sehr selten oder überhaupt nicht zu gewinnen waren.
Auffallend ist die Schärfe der Banden im Monomeren - Bereich nach Behandlung mit DSI oder DTBP, während mit MMB sich keine Monomeren qualitativ nachweisen lassen. Nach Einsatz mit DTBP zeigen sich im Bereich der Untereinheiten e und f je zwei gleichstarke Banden, im Bereich von d und bc vier fast gleichstarke Banden, die zudem gleich weit auseinander liegen. Bemerkenswert ist, daß keine Bande in Höhe der ff - Bande zu erkennen war.
Nach Umsetzung mit DSI gewinnt man dasselbe Monomerenmuster wie nach der Dissoziation von 37 S-Hämocyanin. Allerdings sind die Banden schärfer und liegen teilweise doppelt vor, z.B. f,d, bc. Eine ff-Bande ist zu beobachten. Wenn eine Bande im Monomeren-Bereich sich nach Behandlung mit " cross-linking " Reagenzien in 2 Banden aufspaltet, läuft immer eine auf der Höhe der entsprechenden nativen Bande. Die zweite ist nur etwas langsamer. Eine mögliche Erklärung ist, daß nur eine Seite des Biimidats eine Bindung mit der Untereinheit eingeht, während die andere beim Abstoppen der Reaktion mit Lysin blockiert wurde.

Abb.33: Schematisches Bandenmuster von 37 S-Hämocyanin, das mit verschiedenen Reagenzien quervernetzt und anschließend (durch Verschieben des pH gegen 9,6) dissoziiert wurde.
Es werden alle auftretenden Banden wiedergegeben, die beim Einsatz der Reagenzien gefunden wurden.
Die Molekulargewichtsbestimmung einzelner Banden erfolgt in Abb.34
Als Referenzen dienen 37 S- und 24 S-Hämocyanin nach 3h Dialyse gegen Glycin/NaOH-Puffer,I = 0,05, pH 9,6.
DSI=Dimethylsuberimidat; DTBP=Dimethyl-3,3-dithiobis-propionimidat; DTSP=Dithiobis (Succinimidat-Propionat); MMB=Methyl-4-Mercaptobutyrimidat.

Das Bandenmuster nach Behandlung mit DTSP muß gesondert diskutiert werden. Es unterscheidet sich von den anderen sehr deutlich. Es lassen sich keine Banden auf der Höhe von 24 S-,(18 S-)und 16 S-Hämocyanin gewinnen. (Sie sind, wenn überhaupt, dann nur schwach zu erkennen). Dagegen kann man Produkte im Bereich von Trimeren, Tetrameren und Pentameren in hoher Ausbeute gewinnen. Die Banden B,C,D lassen sich auch hier wiederfinden. Sie sind im Vergleich mit denen nach Behandlung mit DSI, DTBP und MMB ausgeprägter (vor allem die Bande D). Zwischen diesen Banden sind noch bis zu drei weitere Banden schwach zu erkennen. Zu erwähnen sind zwei scharfe Banden im Bereich der Banden F und G.

Zusammenfassend kann man sagen:

a) Alle Zwischenstufen, die bei der Dissoziation und Reassoziation auftreten, werden auch bei Quervernetzung des nativen 37 S-Hämocyanins und nachfolgender Dissoziation gefunden: 16 S-, 18 S-, 24 S-, 28 S- und 37 S-Hämocyanin.
b) Durch Quervernetzung mit DSI, DTBP und MMB wurden gleichartige Aggregate erhalten, wenn auch in unterschiedlicher Ausbeute.
c) Durch Einsatz von DTSP lassen sich vor allem hochmolekulare Aggregate gewinnen und die niedermolekularen " Differenz - Partikel zwischen diesen und dem vollständigen Hämocyanin (Trimere, Tetramere, Pentamere) nachweisen.
d) Es lassen sich durch geeignete Wahl der Reagenzien alle möglichen intermediären Aggregate gewinnen: mit DTBP oder DTSP: Trimere (3 Polypeptidketten), Tetramere (4 Polypeptidketten) und Pentamere (5 Polypeptidketten); mit DSI und in eingeschränktem Maße auch mit DTBP und MMB, Hexamere (6 Polypeptidketten),

Heptamere (7 Polypeptidketten) und Aggregate mit 8,9,10,11 und 12 Polypeptidketten; größere Aggregate erhält man vor allem mit DTSP.

7.3. Bestimmung der Anzahl der Untereinheiten von einzelnen quervernetzten Aggregaten.

Um die Anzahl der Untereinheiten in den einzelnen quervernetzten Produkten zu bestimmen, wurde die Methode nach Hedrick and Smith (1963) angewendet. Hierbei wird die relative Laufstrecke von Proteinen in verschiedenprozentigen Polyacrylamidgelen (4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5%) gemessen. Dabei ist von Vorteil, daß die Proteine nicht denaturiert werden müssen; auch im vorliegenden Falle wurden die quervernetzten Oligomere direkt eingesetzt. Als Eichproteine wurden Hämocyanine von verschiedenen Arthropoden verwendet: Dimere (2 Polypeptidketten) Androctonus australis und Homarus americanus - Hämocyanin, 16 S-, 18 S- und 24 S-Hämocynin, (6,7 und 12 Polypeptidketten) aus Cupiennius salei (Markl, 1980), 24 S-Hämocyanin (12 Polypeptidketten) aus Homarus americanus und 37 S Hämocyanin (24 Polypeptidketten) aus Eurypelma californicum. Die verschiedenen R_F -Werte werden als Ordinatenwerte logarithmisch gegen die Prozentzahl des Gels als Abszisse (linear) aufgetragen, wobei sich Geraden mit einer Steigung n zwischen 0 und 1 ergeben. Aus der Auftragung der Steigung gegen das Molgewicht, bzw. der Kettenzahl im vorliegenden Fall, erhält man eine Eichgerade (Abb.34). Die Steigungswerte der einzelnen quervernetzten Aggregate ergeben an Hand dieser Eichgerade die Anzahl an Untereinheiten.
Die Anzahl an Untereinheiten für die einzelnen Banden ergibt sich daraus wie folgt:

Bande	A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	O
Anzahl der Untereinheiten	24 (19)	18 (15)	17	14	12	11	10	8	7	7	6	5	4	3

Hervorzuheben ist, daß es durch den Einsatz von " Quervernetzungsreagenzien " möglich ist, Trimere, Tetramere und Pentamere herzustellen.
Da sich alle Aggregate, auch die höheren, durch die Anordnung der Untereinheiten auszeichnen, wie sie der im nativen 37 S-Hämocyanin entspricht, sollte es möglich sein, nach ihrer Isolierung Untersuchungen zur Nachbarschaftsbeziehung oder zu funktionellen Wechselwirkung der Untereinheiten durchzuführen. Leider konnten diese Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr ausgeführt werden.

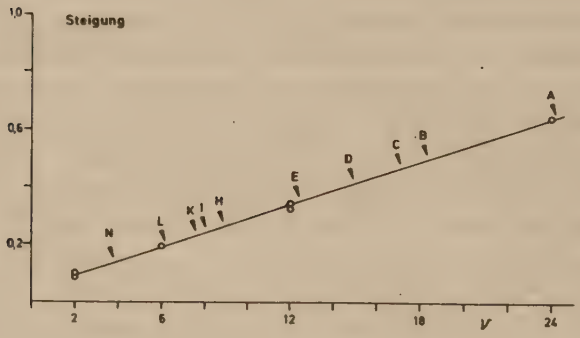


Abb.34: Bestimmung der Anzahl der Polypeptidketten, die einzelne quervernetzte Produkte (durch Buchstaben bezeichnet) enthalten, nach der elektrophoretischen Methode von Hedrick and Smith (1968). Die Steigung wurde aus dem Logarithmus der relativen Beweglichkeit der Komponenten im Verhältnis zur Front in Abhängigkeit von verschiedenen Acrylamidgelkonzentrationen ermittelt.
Gelkonzentrationen: 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6% und 6,5%.
Als Referenzsubstanzen wurden 7 S- (2 Polypeptidketten), 16 S- (6 Polypeptidketten), 24 S- (12 Polypeptidketten) und 37 S-Hämocyanin (24 Polypeptidketten) verwendet.

8. Limitierte Proteolyse des 37 S-Hämocyanins

8.1. Analytische Untersuchungen

Eine andere Möglichkeit, Teilaggregate mit der nativen Architektur zu gewinnen, bietet sich durch limitierte Proteolyse von 37 S-Hämocyanin an. Da für ein stabiles 37 S-Hämocyanin alle Untereinheiten notwendig sind, sollte durch limitierte Proteolyse, die eventuell nur einzelne Untereinheiten erfassen würde, die Stabilität des Molekülkomplexes gestört werden. Der einsetzende Zerfall sollte größere Bruchstücke erbringen. Außerdem sollte man Aussagen über Untereinheiten machen können, die " außen " sitzen, da sie wegen der exponierten Lage eher angegriffen würden, als die, die im " Innern " des Molekülkomplexes liegen. Die Analyse der dabei zeitlich früher auftretenden proteolytischen Abbauprodukte der isolierten Untereinheiten sollte dies ermöglichen.

Ausgegangen wurde vom 37-S Hämocyanin. Es wurde zeitabhängig mit Trypsin gespalten und das Reaktionsgemisch in der alkalischen und SDS-Plattengelelektrophorese untersucht. Parallel dazu wurden nach 0, 90, 120 und 210 Minuten Spaltzeit Proben entnommen und in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht. In ihr und durch zweidimensionale Immunelektrophorese wurde die Einheitlichkeit des Ausgangsmaterials unter den gewählten Bedingungen überprüft. Es wurde bestätigt, daß 37 S Hämocyanin in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat Puffer einheitlich vorlag (Abb.35).

Abb.35 : Zweidimensionale Immunelektrophorese nach limitierter Proteolyse (Trypsin) von undissoziiertem 37 S-Hämocyanin. Antiserum: gegen natives 37 S-Hämocyanin.
Die Doppellinie ist ein Artefakt, der beim Trocknen des Gels durch ein Kippen der Bande auftritt.

Eine geringe Menge an Begleitprotein, wie Abb.36 zeigt, störte die Versuche in keiner Weise.

Schon nach relativ kurzer Spaltzeit (ca. 1 Min.) traten Untereinheiten auf. In der SDS-Plattengelelektrophorese sind schon nach 15 Minuten die charakteristischen Bruchstücke von Untereinheit b (54000 und 14000 Dalton) und Untereinheit d (37000 und 34000 Dalton) zu finden; nach 90 Minuten zusätzlich die von e und a, und nach 210 Minuten die von allen Untereinheiten (Abb.36 ; Strych, 1981). Auch in der analytischen Ultrazentrifuge konnte der Zerfall des 37 S Hämocyanins mit zunehmender Spaltzeit nachgewiesen werden (Tab. 10).

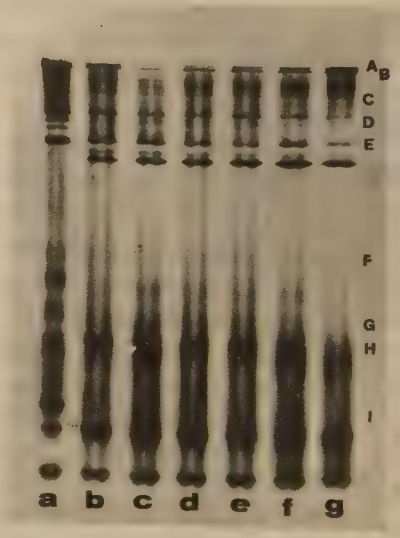
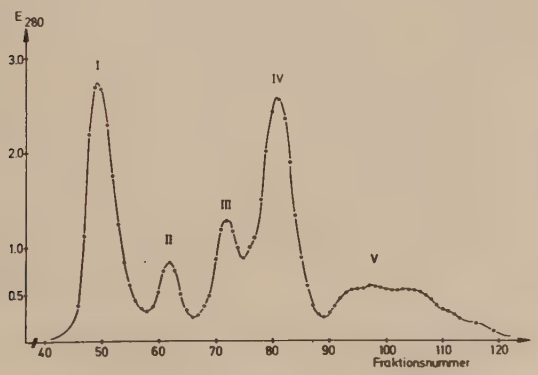


Abb.36: PAGE von undissoziiertem 37 S-Hämocyanin nach limitierter Trypsinolyse.
Gelsystem nach Laemmli (1970) ohne SDS, Acrylamidgradient: 5-15%.
a=1 min.; b=15 min.; c=30 min.; d=60 min.; e=90 min.; f=120 min. g=210 min.
A=37 S; B=28 S; C=24 S; D=18 S; E=16 S-Begleitprotein; F=11 S; G=f-f; H=d,bc; I=a,e,f,g.
Die S-Werte sind als Schätzwerte zu betrachten.
(siehe auch Strych, Dissertation 1981)

8.2. Versuche zur Trennung der durch limitierte Proteolyse gebildeten Spaltprodukte und deren Charakterisierung.

In größeren Ansätzen wurden 30 bis 50 mg 37 S-Hämocyanin 210 Minuten lang mit Trypsin gespalten, und die entstandenen Produkte säulengelchromatographisch getrennt. Die Trennungen erfolgten über Biogel A 1,5 m in zwei verschiedenen Puffersystemen (0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatpuffer, pH 8,0, und 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0). Die Ergebnisse waren in beiden Puffersystemen gleichartig (Abb.37 und 39). In der analytischen Ultrazentrifuge wurde ein Gemisch aus 31,6 S-(37,2%), 15,1 S-(8,3%) und 3,1 S-(53,3%) Komponenten gefunden. Die einzelnen Gipfel wurden in der analytischen Ultrazentrifuge, sowie durch alkalische und SDS-Plattengelelektrophorese untersucht.

Abb.37: Säulengelchromatische Trennung der Produkte nach limitierter Proteolyse von 37 S-Hämocyanin.
Biogel A 1,5 m mit 0,1 M $(NH_4)HCO_3$-Puffer, pH 8,0, bei 4°C
Säule: 0,9 x 135 cm. Durchflußgeschwindigkeit: 2 ml/h.
Die Zahlen I-IV beziehen sich auf die untersuchten Gipfelfraktionen (siehe Text).
(gemeinsam mit Strych, Dissertation, 1981)



Der geringe prozentuale Anteil an 37 S-Hämocyanin (ca. 72%) zum Zeitpunkt O (Abb.36) läßt sich mit dem Alter der Probe erklären (die Isolation des 37 S-Hämocyanins lag bereits 3 Wochen zurück). Neben Monomeren (ca. 4 S), Dimeren (ca. 5,8 S), Trimeren oder Tetrameren (ca. 9 S) waren noch größere Aggregate mit S-Werten zwischen 26 und 31 S (sehr verwaschene Bande) zu erkennen. Nach einer Spaltzeit von 210 Minuten war eine 16 S Bande zu beobachten.

Tab. 10 : Limitierte Proteolyse (2 % Trypsin, pH 8,0, 37°C) von undissoziiertem Eurypelma-Hämocyanin (37 S). Prozentualer Anteil verschiedener Komponenten an Hand der Auswertung von Scans bei analytischer Ultrazentrifugation (32 000 UpM). Die Proteinkonzentration lag jeweils bei ca. o,5 mg/ml.

Spaltzeit (Minuten)	33 S	26-32 S	ca. 9 S	4-6 S	2 S
0	72	-	-	28	-
90	70	-	8	21	-
210	-	61	-	27	12

Gipfel I: Für die Fraktion 50 wurden 2 Komponenten ermittelt: eine zu 60%, die mit 34,0 S, und eine zu 40%, die mit 5,6 S sedimentierte. Nach Dissoziation dieser Fraktion und zweidimensionaler Immunelektrophorese fand sich nahezu die selbe Untereinheitenverteilung wie im nativen 37 S-Hämocyanin:
a + (b+c) + d + e + f + g = 4 + (2+2) + 3 + 4 + 4 + 4
(Abb.38). Dies läßt den Schluß zu, daß diese Fraktion die Ausgangssubstanz nach Verlust der Untereinheit vom Typ d darstellt. Diese war in Form ihrer Bruchstücke in Gipfel V (Fraktion 98), neben denen von bc, durch zweidimensionale Immunelektrophorese nachweisbar. Es ist bemerkenswert, daß durch Einsatz spezifischer Antiseren gegen d bzw. bc noch Antigendeterminanten der Bruchstücke von beiden Untereinheiten erkannt werden.

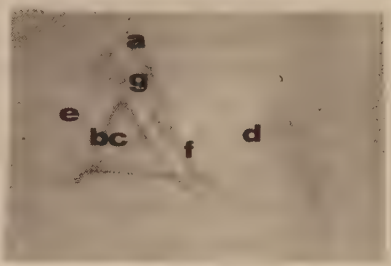


Abb.38 : Zweidimensionale Immunelektophorese von Fraktion 50 nach Dissoziation in Glycin/NaOH, pH 9,6. Antiserum gegen Gesamtdissoziat des Hämocyanins aus Eurypelma californicum.

In der alkalischen PAGE sieht man jedoch nur sehr wenig 37 S-Hämocyanin, dagegen sind Komponenten im Bereich von 18 S und 24 S zu beobachten, neben weiteren Assoziationsstufen und Monomeren sowie Dimeren) bc oder d, a, e), Hervorzuheben ist, daß keine 16 S-Bande auftritt.
Das 37 S-Hämocyanin scheint also bei Behandlung mit Trypsin die Untereinheit d rasch zu verlieren und dann über verschiedene Zwischenstufen (vor allem 28 S und 18 S) in die Untereinheiten zu zerfallen. g und f wurden nicht nachgewiesen.

Gipfel II (Fraktion 71): In der analytischen Ultrazentrifuge sind zwei Komponenten zu sehen, die mit 14,3 S (68,7%) und 6,1 S (31,7%) sedimentieren. Den größten Beitrag dazu liefert das Begleitprotein. Überraschenderweise ähnelt die Zusammensetzung der Untereinheiten im Gipfel II der von Gipfel I (Fraktion 50; 34,0 S). Multipliziert man die durch quantitative Auswertung errechnete Untereinheitenverteilung mit dem Faktor 2, so kommt man zur selben Verteilung wie in Fraktion 50, d.h. Gipfel II würde einem 24 S-Hämocyanin entsprechen, dies steht aber im Widerspruch zum bestimmten Sedimentationswert von 14,3 S; es muß deshalb ein Gemisch von verschiedenen Aggregaten angenommen werden.

In der PAGE sind neben dem Begleitprotein zwei 16 S-Banden und eine 18 S-Bande zu erkennen. Bei den Untereinheiten findet man wieder e,a,d,bc. Das zusätzliche Auftreten des Homodimers ff läßt sich durch partielle Dimerisierung von f erklären.

Die 18 S-Bande ist ein Dissoziationsprodukt vergleichbar dem unter Punkt C.6. Die zwei 16 S-Banden sind sehr wahrscheinlich Reassoziationsprodukte, man muß berücksichtigen, daß mit dem pH 8,0 bei der Chromatographie unter idealen Reassoziationsbedingungen gearbeitet wurde.

Die Hexamere enthalten die reassoziationsfreudigen Untereinheiten f,g und bc. Sie treten im immunelektrophoretischen Muster in Erscheinung, sind in der PAGE jedoch nicht zu erkennen.

Gipfel III (Fraktionen 71-73): Dieser Gipfel enthält überwiegend g,f und bc. Aus dem Sedimentationskoeffizienten von 6,1 S kann man auf ein Gemisch von Monomeren und Dimeren schließen. Letztere werden durch (g + f)und größere Mengen bc repräsentiert, erstere durch g, f a und wenig e.

Im Gipfel IV sind ausschließlich Monomere zu finden.

Unter dem Gipfel V sind die Bruchstücke der einzelnen Untereinheiten, vor allem d und bc, zu finden.

Wurde die gesamte Trennung in einem anderen Puffersystem 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5, durchgeführt, so erhielt man sehr ähnliche Ergebnisse (Abb.39). Herauszuheben ist hier Gipfel II, der sich zu 34,5% aus 33,2 S und 60,5% aus 14,0 S-Material zusammensetzt. Dabei kann die 14,0 S-Komponente durch Erhöhung der Drehzahl auf 36000 UpM in eine 15,4 S-Komponente und eine 11,5 S-Komponente (54,3%) aufgespalten werden. Die erste stellt vermutlich das Begleitprotein dar, die zweite hat die Größenordnung eines Tetramers.

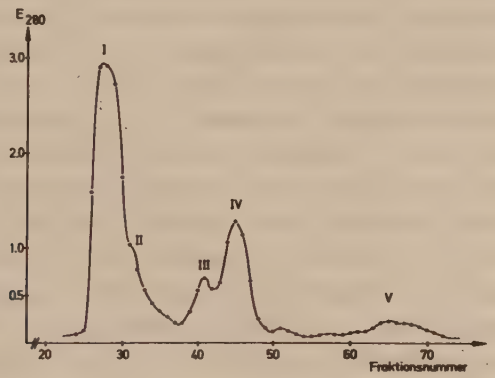


Abb.39 : Säulenchromatische Trennung der Abbauprodukte von 37 S-Hämocyanin nach limitierter Trypsinolyse über Biogel A 1,5 m mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, bei Raumtemperatur. Säule: 0,9 x 100 cm; Durchflußgeschwindigkeit: 3 ml/h.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Im Oligomer sind die Untereinheiten b, d, e und a der Spaltung durch Trypsin gut zugänglich.

2) Für die Stabilität des 37 S-Hämocyanins ist die Anwesenheit von allen Untereinheiten nötig, da die Spaltung und das nachfolgende Abdissoziieren (" Abbrechen ") von vermutlich schon einer einzigen Untereinheit die Quartärstruktur des Oligomers destabilisiert. Es zerfällt dann spontan über Zwischenstufen in der Größenordnung von 28 S, 18 S und 12 S in Dimere und Monomere.

9. Zur Funktion des Hämocyanins

9.1. Das Hill - Diagramm

Die Funktion eines respiratorischen Pigments wird im allgemeinen durch die Affinität und die Kooperativität charakterisiert. Ein Maß für die Affinität ist der Halbsättigungsdruck p_{50}, d.h. der Sauerstoffpartialdruck, bei dem 50% des Pigments mit Sauerstoff gesättigt sind; niedrige p_{50}- Werte bedeuten hohe, hohe p_{50}- Werte bedeuten eine geringe Affinität. Ein Maß für die Kooperativität ist die **Steigung** $n_{50} = n_H$ der Kurve am Halbsättigungsdruck im Hill - Diagramm (Abb.40); n_H muß von der maximalen Steigerung $n_{H,max}$ unterschieden werden. Das Hill - Diagramm stellt die derzeit geeignetste Form der Darstellung der Sauerstoffbindungskurven zur graphischen Erfassung von Affinität und Kooperativität dar. Es ist eine doppelt logarithmische Auftragung $\log \frac{y}{1-y}$ vs. $\log pO_2$ (dabei ist y der Anteil des beladenen, (1-y) der Anteil des unbeladenen Hämocyanins); die Sauerstoffbindungskurven werden dazu gemäß der sogenannten Hillgleichung

$$\log \frac{y}{1-y} = \log K + n_H \log pO_2$$

transformiert. Liegen ausreichend viele verwertbare Meßwerte auch bei den niedrigen und hohen Sauerstoffdrucken vor, so kann man zwei Asymptoten gewinnen, die die Abscisse bei $\log p_{diss,R}$ (= hoher Beladungszustand) und $\log p_{diss,T}$ (= geringe Beladung) schneiden. Sie stellen die "intrinsischen" Dissoziationskonstanten für den ersten und letzten Desoxygenierungsschritt dar. Mit größerer Sicherheit lassen sich diese Konstanten durch einen modifizierten Scatchardplot (nach Edsall et al., 1954) graphisch ermitteln (z.B. Loewe, 1978). Dabei wird $\log Q = \log \frac{y}{1-y} - \log pO_2$ gegen ν (Anzahl der Bindungsstellen)

aufgetragen. $p_{diss,\,T}$ bzw. $p_{diss,R}$ gewinnt man aus den log Q -Werten, wenn $\nu \to 1$ bzw. $\nu \to 24$ geht.
Nach der Vorstellung von Monod et al. (1965) ist $K_{diss,R} / K_{diss,T} = c$. Daraus folgt nach Wyman (1964) die freie Energie der Wechselwirkung $\Delta G_I = RT \ln c$.
ΔG_I für $p_{diss,T}$, $p_{diss,R}$ und p_{50} ergibt sich zu
$\Delta G_I = RT \ln (\kappa\, p_{diss})^{-1}$; ($\Delta G_{I,T}$; $\Delta G_{I,R}$; $\Delta G_{I,p_{50}}$).
(κ ist der Bunsensche Löslichkeitskoeffizient).

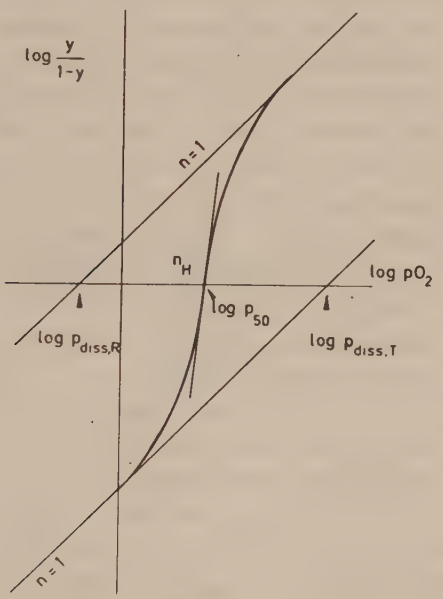


Abb.40 : Schematische Darstellung eines Hilldiagramms mit den Konstanten, die daraus gewonnen werden können.

p_{50} = Halbsättigungsdruck (Torr)
n_{50} = Kooperativität am Halbsättigungsdruck
$p_{diss,R}$; $p_{diss,T}$ = " intrinsische " Dissoziationskonstanten (Torr)

2.2. Fehlerbetrachtung

Zur Fehlerberechnung muß zuerst die Auflösung der entsprechenden Werte in der Originalregistrierung (Sättigung vs. Sauerstoffpartialdruck pO_2) diskutiert werden. Dazu gehe man davon aus, daß 100% Sättigung 20 cm und die Distanz zwischen pO_2= 0 Torr und dem jeweils gewählte pO_2 Eichwert ebenfalls 20 cm in der Aufzeichnung entsprechen. Benutzt wurden die Eichgase 2%, 5% und 10% Sauerstoff, der Rest war Stickstoff. Die Abgreifgenauigkeit des Digitalisiertabletts liegt bei 0,1 mm. Man muß jedoch von einer manuellen Abgreifgenauigkeit von $\pm$ 0,5 mm ausgehen. Somit muß bei der Bestimmung der Sättigung ein Fehler von $\pm$ 0,25% des Nominalwertes berücksichtigt werden. Der Fehler des zugeordneten pO_2-Wertes liegt bei ca. $\pm$ 0,1 Torr (bezogen auf einen Eichwert von 5% Sauerstoff).
Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Werte wurde a) dieselbe Probe wiederholt hintereinander, und b) verschiedene Proben aus ein und demselben Hämocyaninpool unter gleichen Bedingungen untersucht (Abb.41). Alle Absorptionsspektren, die jeweils vor und nach der Messung gewonnen wurden, waren deckungsgleich. Auch im Hillplot konnten alle Messungen gut zur Deckung gebracht werden. Anhand der Abb.41 ersieht man, daß die log p_{50}-Werte um nicht mehr als 0,01 differierten, d.h. der delogarithmierte p_{50}-Wert konnte auf $\pm$ 2-3%, bezogen auf den Nominalwert, genau reproduziert werden. Für a) betrug der Mittelwert und die Standardabweichung p_{50}= 36,3$\pm$0,9 Torr (3 Messungen), für Fall b) p_{50}=36,0$\pm$0,5 Torr (2 Messungen).
Der n_{50}-Wert wird im Hillplot aus der Steigung der Tangente am Halbsättigungsdruck (log p_{50}) gewonnen. Wegen der kontinuierlichen Aufzeichnung stehen beliebig viele Werte zur Verfügung. Der Fehler kann auf maximal $\pm$ 5% der Nominalwerte eingeschränkt werden. Dies entspricht etwa auch dem von Jeffrey and Treacy (1980) angenommenen Wert.
Problematisch - auch in der Literatur - ist die Bestimmung der Asymptoten. Der relativ gut gesicherte Meßbereich erstreckt sich von 5% bis 95%-Sättigung. Durch die hier verwendete Apparatur und die kontinuierliche Aufzeichnung ist es möglich, den Bereich auf fast 0 - 100% Sättigung aus-

zudehnen. Die trotzdem auftretende (aber jetzt geringere) Streuung in den Grenzbereichen ist auf die Transformation der Originaldaten in das Hill-Diagramm zurückzuführen. Z.B. entspricht in der Originalabbildung eine geringe Zunahme der Sättigung von 97% auf 99%, eine Strecke von ca. 4 mm, im Hillplot jedoch einer großen Zunahme des $\log \frac{y}{1-y}$ um 0,5, während ein gleichgeringer Sättigungsunterschied im Bereich des Halbsättigungsdruckes, der auch hier wieder ca. 4 mm entspricht, jedoch nur eine Zunahme des $\log \frac{y}{1-y}$ von 0,05 bedeutet.

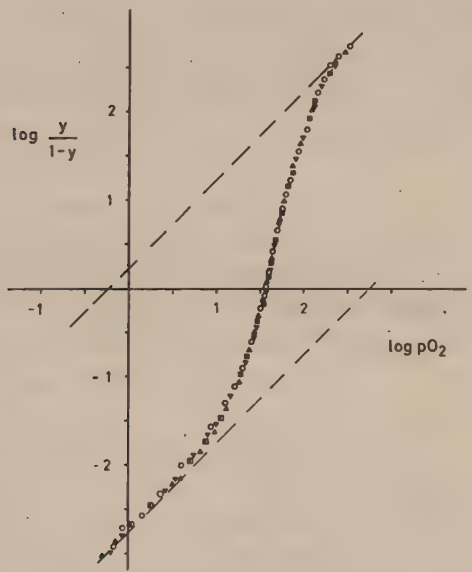


Abb.41:Hill-Diagramm der Sauerstoffbindung durch das 24 S-Hämocyanin aus Homarus americanus. Drei Kurven (○, ▽, ◧) wurden hintereinander aufgenommen (Fall a.). Für Kurve (▲) wurde eine neue Probe entnommen (Fall b.).
Meßbedingungen: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,00, 40 mM Ca^{2+};
für a) ergibt sich p_{50}= 36,3±0,8 Torr, für b) p_{50}=36,0±0,5 Torr;
$n_{H,max}$ = 4,8;
$p_{diss,R}$ = 0,562±0,05 Torr, $p_{diss,T}$ = 537,02±25,95 Torr
(die Werte wurden mit Hilfe des modifizierten Scatchard-plots gewonnen);
$c = p_{diss,R}/p_{diss,T}$ = 0,00105; $\Delta G_I = RT \ln c$ = 3,983 kcal/Mol
bei 20,0°C; L_o ergibt sich zu $L_o = c^{-N/2} = 8{,}64 \cdot 10^8$, wobei N=6 angenommen wurde (nach Duc et al., 1973).

10. Funktionelle Charakterisierung der isolierten Untereinheiten von Eurypelma californicum

Um die funktionelle Rolle der einzelnen Untereinheiten in dem 37 S-Hämocyaninkomplex abschätzen zu können, erschien es sinnvoll, zuerst die individuellen Untereinheiten hinsichtlich ihrer Funktion zu charakterisieren. Dazu wurde vor allem der Einfluß des pH und der Temperatur untersucht.

10.1. Abhängigkeit vom pH

Von den einzelnen Untereinheiten wurden Sauerstoffbindungskurven erstellt. Daten, die im Hillplot nicht eine Gerade ergaben, oder deren n_H —Wert sich um mehr

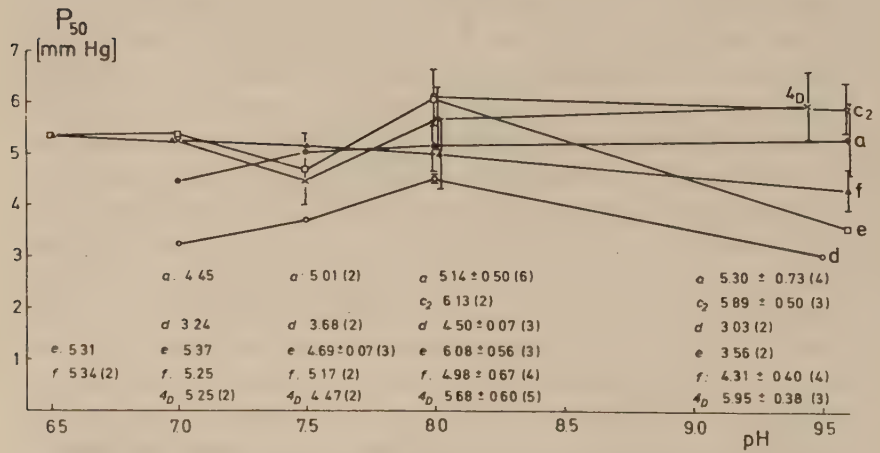


Abb.42: Halbsättigungsdrucke der individuellen Untereinheiten des Eurypelma californicum-Hämocyanins und ihre Abhängigkeit von dem pH; T = 20°C.
Die numerischen Werte und ihre Standardabweichungen sowie die Anzahl der Messungen werden angegeben. Folgende Puffersysteme wurden benutzt: für pH 6,5-8,0 Tris/HCl (I = 0,1), für pH 9,6 Glycin/NaOH (I = 0,05)
Untereinheit c_2 entspricht Untereinheit g (neuere Nomenklatur) (siehe Decker et al., 1979)

als ± 0,1 von 1 unterschieden, wurden verworfen. Die Proteinkonzentration lag zwischen 0,1 - 1 mg/ml.
Es ist wichtig zu bemerken, daß die isolierten Untereinheiten unter diesen Bedingungen nicht reassoziieren.
Die Affinität aller Untereinheiten war über dem gesamten pH-Bereich (pH 6,5 - 9,6) sehr hoch (Abb.42)
Die p_{50} -Durchschnittswerte aller Untereinheiten betrugen 5,33; 4,75; 4,60; 5,43 und 4,75 Torr bei den pH-Werten 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 und 9,6. Die p_{50} -Werte für die Untereinheit d lagen für jeden untersuchten pH Wert niedriger als bei allen anderen Untereinheiten. Der Unterschied ist bei pH 7,5 und 9,6 auf dem 5% Niveau signifikant (Student-Test).
Mit der möglichen Ausnahme von d existiert offensichtlich kein Bohreffekt.
Von besonderem Interesse ist das Heterodimer bc; es zeigt im untersuchten pH-Bereich (pH 7,0 - 9,6) keine kooperative Bindung von Sauerstoff. Die getrennten Ketten b und c besaßen nach Harnstoffentzug (teilweise) noch die Fähigkeit, Sauerstoff zu binden. Es liegen nur wenige gesicherte Messungen vor.

10.2. Temperaturabhängigkeit

Die Untersuchung erfolgte im Temperaturbereich von 10 - 30°C.
Die p_{50} -Werte der einzelnen Untereinheiten bewegen sich bei T = 30,0°C zwischen 6,8 - 13,6 Torr mit einem Mittelwert von 10,4 Torr. Dabei nimmt der p_{50} von 20°C auf 30°C um 1,4 - (für Untereinheit e) bis 2,7 fach - (für Untereinheit f) zu (Tab. 11). Auch bei 30°C konnte für keine Untereinheit ein Bohreffekt beobachtet werden.
Der Mittelwert aller p_{50} -Werte von allen Untereinheiten

beträgt 5,42 Torr für T = 20°C und 10,41 Torr für 30°C. Daraus ergibt sich ein Q_{10} von 1,9. Er liegt in der Größenordnung von enzymatischen Prozessen.
Auffallend ist der Unterschied in den Affinitäten zwischen d einerseits und f und g andererseits. Letztere besitzen bei 30°C mit 13,4 bzw. 13,6 Torr die niedrigste Affinität, während diese bei d mit 6,8 Torr doppelt so hoch ist.
Mit Hilfe des van't Hoff-Diagramms (log p_{50} vs. 1/T) berechnet sich die Enthalpie für die Sauerstoffbindung ΔH (bezogen auf die Mittelwerte) zu ΔH = 1o.168 kcal/Mol grd (Abb.43).

Tab.11 :Abhängigkeit des p_{50} (in Torr) der Untereinheiten von der Temperatur (Mittelwerte aus jeweils 2 Messungen) 0,1 M Tris/HCl; c_{Hc} = 0,15 mg/ml

	T	Untereinheiten					
		a	d	e	f	g	bc
a) pH 8,0	20°C	5,14	4,40	6,08	4,98,,6,13		5,68
	30°C	9,50	6,80	8,52	13,35	13,55	10,73
	10°C	-	-	-	2,29	-	2,10
b) pH 9,6	20°C	5,30	3,03	3,56	4,31	5,89	5,95
	30°C	-	7,42	-	9,96	-	11,39
	10°C	-	-	-	-	-	2,21

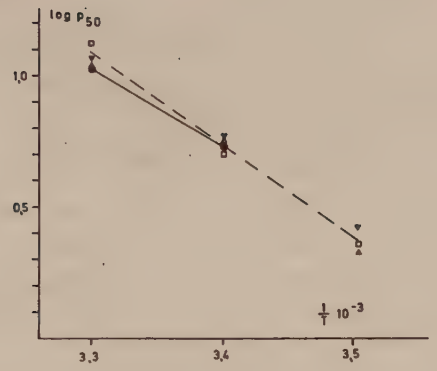


Abb.43 : Logarithmische Auftragung des Halbsättigungsdruckes der Untereinheiten gegen die reziproke absolute Temperatur; (van't Hoff-Diagramm). Errechneter Mittelwert aller Untereinheiten bei pH 8,0 = ○—● ;Untereinheit f bei pH 8,0 = Δ Heterodimer bc bei pH 8,0 = ▽ , bei pH 9,6 = □

10.3. Abhängigkeit von der Pufferspezies

Ein signifikanter Einfluß verschiedener Puffer auf die Bindungseigenschaften der Untereinheiten ist nicht zu erkennen. Verglichen wurden 0,1 M Tris/HCl-Puffer und 0,1 M (NH_4)HCO_3-Puffer bei pH 8,0. Auch die mit Glycin/NaOH Puffer bei pH 9,6 erhaltenen Daten fügen sich widerspruchslos in das Bild ein (Tab. 12). In jedem Fall besaß d die größte Affinität.

10.4. Alterung der Untereinheiten

Eine mögliche Fehlerquelle bei der Charakterisierung der Untereinheiten wären Einflüsse von Alterung oder Vorbehandlung der Proben während der vielen notwendigen Schritte bei der Isolierung der Untereinheiten. Frl. Groß (Zulassungsarbeit, 1981) untersuchte dieses Problem an dissoziiertem 37 S-Hämocyanin. Die p_{50} -Werte blieben über Wochen hinweg konstant bei ca.5 Torr, welche

Tab.12: Einfluß der Pufferspezies auf die Bindungseigenschaften von isolierten Untereinheiten von Eurypelma californicum; T = 20,0°C.
(Mittelwert aus jeweils 2 Messungen)

Pufferspezies / Untereinheiten	pH 8,0 0,1 M Tris/HCl P_{50} (Torr)	pH 8,0 0,1 M $(NH_4)HCO_3$ P_{50} (Torr)	pH 9,6 0,05 M Glycin/NaOH P_{50} (Torr)
a	5,14	5,89	5,30
d	4,50	4,17	3,03
e	6,08	4,35	3,56
f	4,98	4,68	4,31
g	6,13	5,92	5,89
bc	5,68	8,32	5,95

dem Wert am ersten Tag entsprachen. Ebenso hatten die verschiedenen Präparationsmethoden keinen Einfluß auf den Halbsättigungsdruck.
Eine Veränderung der Sauerstoffbindungseigenschaften der isolierten Untereinheiten durch Alterung oder Vorbehandlung der Proben ist also innerhalb des Untersuchungszeitraumes (bis ca. 18 Tage, von der Entnahme der Hämolymphe ab gerechnet) mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

11. Funktionelle Charakterisierung der isolierten Untereinheiten von Cupiennius salei

Es konnten bisher nur von sehr wenigen Hämocyaninen Untereinheiten rein isoliert und dann funktionell untersucht werden. Zuerst war dies bei den Untereinheiten des 37 S-Hämocyanins aus Eurypelma californicum der Fall, (diese Arbeit; Decker et al., 1979). Weitere Daten liegen für die Untereinheiten des 37 S-Hämocyanins aus Androctonus australis vor (Lamy et al., im Druck, 1981).
Markl et al. (1979a) gelang die teilweise Isolierung der Untereinheiten des 16 S- bzw. 24 S-Hämocyanins aus Cupiennius salei. Durch Gelfiltration und Polyacrylamidgelelektrophorese konnten 6 elektrophoretisch unterschiedliche Banden gefunden werden, von denen jedoch 5 Banden (Monomere) immunologisch identisch waren, und eine Bande ein Homodimer darstellte(Markl, 1980; Markl and Kempter, 1981d). Die Sauerstoffbindungskurven lieferten folgende Resultate (Tab.13):
a) Die untersuchten 5 Monomerenfraktionen setzen sich zu etwa gleichen Teilen aus jeweils zwei Untereinheiten zusammen: 1+2, 2+3, 3+4. Nur die Bande 5 lag isoliert vor. Die Affinität betrug für alle Fraktionen p_{50} = 3,5 - 3,6 Torr und war identisch mit dem Gemisch aus allen 5 Monomeren. Eine Kooperativität war nicht nachweisbar (n_{50} = 1,0).
b) Die Affinität der Dimerenfraktion war mit p_{50} = 2,70 Torr höher als die entsprechende des Monomerengemisches. Das Dimer besaß keine Kooperativität (n_{50} = 1,0). Dieser Unterschied in der Funktion (Affinität) von Monomeren und Dimeren wurde auch von Markl et al. (1981c) bestätigt. Die k_{off} -Werte (Sauerstoffdissoziationskonstanten) waren für die Dimeren (k_{off} = 10,4 s^{-1}) doppelt so hoch wie für das Monomerengemisch (k_{off} = 5,4 s^{-1}).
c) Die Affinitäten der Untereinheiten der Hämocyanine aus Cupiennius salei und Eurypelma californicum haben mit p_{50} = 3-6 Torr die gleiche Größenordnung.
d) Während für die Untereinheiten vom Eurypelma-Hämocyanin kein Alterungseffekt nachweisbar ist, ist er für die des Cupiennius-Hämocyanins jedoch nachweisbar. Messungen nach einem Tag nach der Isolierung (d.h. etwa 2-3 Tage nach

der Entnahme der Hämolymphe) ergaben eine deutlich höhere Affinität für die Monomeren und für das Dimer (p_{50} = 1,7 bzw. 1,3 Torr) als nach 6 Monaten (Tab.13). Eine Erklärung war dafür nicht zu finden.

Die sehr ähnlichen p_{50}-Werte bestätigen die Vermutung, daß die Monomeren einander sehr ähnlich sind, wie es schon mit proteinchemischen (Strych, 1981) und immunologischen Methoden (Markl et al., 1980) gezeigt wurde. Die elektrophoretische Heterogenität sollte auf relativ geringfügige Veränderungen, wie unterschiedlichem Gehalt an Glutamin / Glutaminsäure oder Asparagin / Asparaginsäure, zurückzuführen sein.

Tab.13: Halbsättigungsdruche p_{50} (in Torr) und Kooperativität der isolierten Untereinheiten von Cupiennius salei. 0,05 M Glycin/NaOH-Puffer pH 9,6; T = 20°C ; c_{Hc} = 0,15 mg/ml (Mittelwerte aus jeweils 2 Messungen)

Untereinheit	p_{50} (Torr)	n_{50}	p_{50} (Torr)	n_{50}
	1 Tag nach der Isolierung		6 Monate nach der Isolierung	
1	1,6	0,9	-	-
1+2	1,6	1,0	3,6	1,0
2+3	-	-	3,6	1,0
3+4	-	-	3,5	1,0
5	1,7	0,9	3,5	1,0
Dimer	1,3	1,0	2,7	1,0
Monomerengemisch	1,7	1,0	3,5	1,0
gesamtes Untereinheitengemisch	1,6	1,0	3,4	1,0

12. Funktionelle Untersuchung der Hämolymphen einzelner Individuen

Um das 37 S-Hämocyanin funktionell zu charakterisieren, war es notwendig, das Hämocyanin zum frühesten Zeitpunkt, d.h. kurz nach der Entnahme der Hämolymphe (vom Tier) zu untersuchen. Solche Proben sollten " Standardwerte " für die Sauerstoffaffinität und Kooperativität liefern, die als Grundlage für einen Vergleich dienen könnten. Von diesen Werten ausgehend, sollten sich zeitabhängige Veränderungen am 37 S-Hämocyanin und Effekte, die durch die Isolierung d.h. Abtrennung von niedermolekularen Stoffen und dem Begleitprotein bedingt sein könnten, besser beurteilen lassen.
Hämolymphe von 8 Individuen wurde entnommen. Durch Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (15 Minuten) wurden Zellen und geronnenes Material abgetrennt. Vom Überstand wurden kleine Volumina entnommen und die Lösung mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, auf eine Proteinkonzentration von 0,1 - 1,0 mg/ ml verdünnt. Es wurde in Ab- und Anwesenheit von 1 mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+} gearbeitet.

Die Proben der einzelnen Individuen unterscheiden sich hinsichtlich des p_{50} und n_H nicht signifikant (Tab. 14). Der p_{50} beträgt 13,82±2,78 Torr und bewegt sich im Bereich von 10,59 - 16,79 Torr. Die Kooperativität n_H beträgt 7,09±0,33 . Sie liegt in jedem Fall über 6 und erreicht Werte von 7,5 (der $n_{H,max}$ -Wert fällt in jedem Fall mit dem n_H -Wert zusammen). Die Bestimmung der Asymptoten der Bindungskurven im Hillplot (Abb.44) erfolgte mit Hilfe des modifizierten Scatchard-Plots (Abb.45). Die damit gewonnenen $p_{diss,R}$ bzw. $p_{diss,T}$ -Werte sind für alle Individuen gleich und ergeben sich zu 0,545 bzw. 251,189 Torr; der daraus ermittelte allosterisch Parameter c ergibt sich zu c = 0,00217.

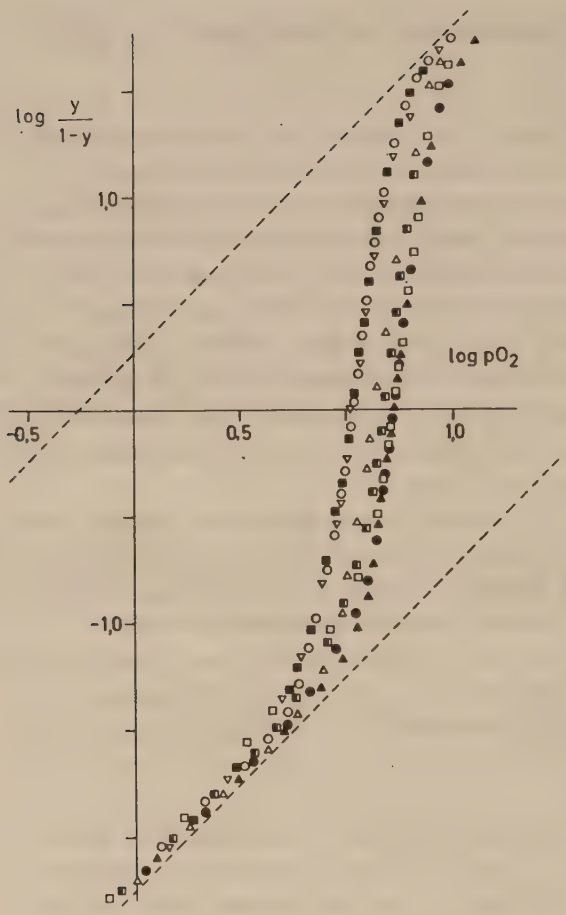


Abb.44: Hilldiagramm der Sauerstoffbindung von 37 S-Hämocyanin aus verschieden Tieren (siehe Tab. 14)
Meßbedingung: 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0; T = 20,0°C; es wurde in Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} gearbeitet, Ausnahmen waren ○ und ● , hier war 1mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+} anwesend.

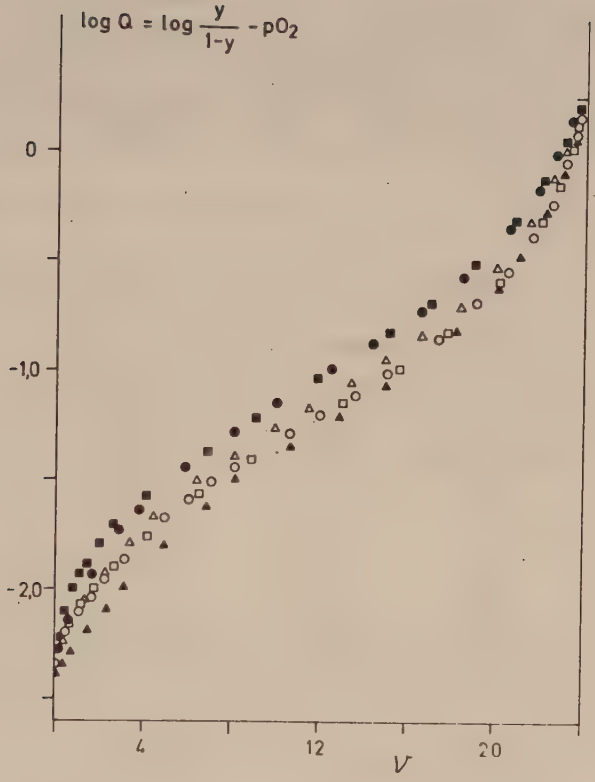


Abb.45: Modifiziertes Scatcharddiagramm der Sauerstoffbindung von 37 S-Hämocyanin aus verschiedenen Tieren .
Daten siehe Abb.44.

Tab. 14 : Halbsättigungswerte, Kooperativität, die Größe der allosterischen Einheit N und die allosterische Gleichgewichtskonstante L_o des 37 S-Hämocyanins von 8 einzelnen Tieren. Die Messungen erfolgten möglichst rasch nach Entnahme der Hämolymphe. Es wurden lediglich die Zellen durch 15- minütiges Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge entfernt. Der Überstand wurde mit 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0; in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von 1mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+} verdünnt und untersucht; c_{Hc} = 0,15 mg/ml; T = 20,0°C.

Nr.	p_{50} (Torr)	n_H	N^a	$L_o'^a$
1 [b]	16,79	7,50	8,83	$3,1\ 10^{12}$
2 [b]	10.84	7,00	8,23	$2,8\ 10^{10}$
3	13,49	6,75	7,93	$2,2\ 10^{10}$
4	10,72	6,61	7,76	$7,3\ 10^{11}$
5	15,14	7,43	8,75	$1,2\ 10^{12}$
6	10,59	7,09	8,28	$1,3\ 10^{10}$
7	16,41	6,94	8,16	$1,9\ 10^{11}$
8	16,60	7,38	8,69	$7,2\ 10^{11}$
	13,82 ±2,78	7,09 ±0,33	8,33 ±0,39	$7,4 \pm 10,5\ 10^{11}$
c	12.30	6,60	8,20	$9,4\ 10^{10}$

a) berechnet aus dem "van Holde-Diagramm"

b) 1 mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+} waren während der Aufarbeitung und Messung anwesend

c) Isolierung eines Gemisches aus 15 Tieren.

Ein Einfluß von Mg^{2+} oder Ca^{2+} -Ionen ist nicht feststellbar. Aus den Ergebnissen kann man schließen, daß das Hämocyanin der einzelnen Individuen gleiche Bindungseigenschaften aufweist. Es erscheint damit berechtigt, weiterhin mit einem Hämolymphegemisch aus verschiedenen Tieren zu arbeiten.

13. Funktionelle Charakterisierung des 37 S Hämocyanins

Bekanntlich haben pH, Temperatur, Ionensärke, Ca^{2+}, Mg^{2+} und Metaboliten wie z.B. 2,3-Diphospoglycerat (DPG) auf respiratorische Pigmente großen Einfluß. Die Auswirkungen dieser Parameter auf die Funktion des Hämocyanins soll im Folgenden - im Anschluß an Loewe (1978) - näher untersucht werden. Loewe hat unter diesen Parametern nur den pH genauer studiert.

13.1. Einfluß des pH

Der Einfluß des pH auf die Bindungseigenschaften des 37 S-Hämocyanins wurde in Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+} untersucht. Dies entspricht der Ionenkonzentration in der Hämolymphe (Schmid, 1976). Dabei wurde das Sediment nach präparativer Ultrazentrifugation in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 gelöst. Über Nacht wurden dann Proben (c = 2 - 5 mg/ml) gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer mit dem entsprechenden pH (7,00; 7,50; 7,80; 8,05; 8,20;) dialysiert. Die Proteinkonzentration bei der Messung lag zwischen 0,1 - 0,2 mg/ml. Die Kontrolle der pH-Werte erfolgte noch einmal vor und nach der Aufnahme der Bindungskurven.
Die Ergebnisse sind in Abb.46,47 und Tab. 15 zusammengefaßt.

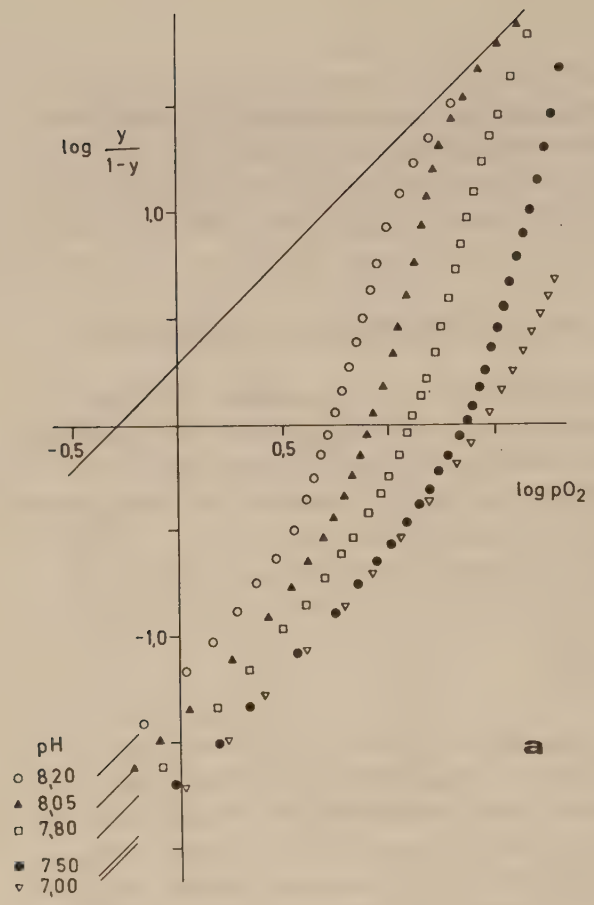
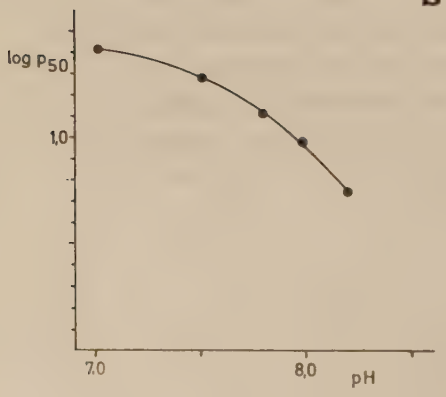
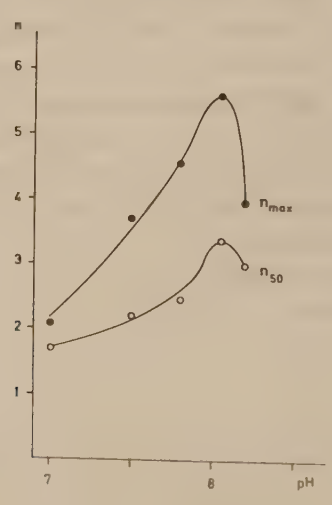

log y/1-y
1,0
-0,5
0,5
log pO2
-1,0
pH
8,20
8,05
7,80
7,50
7,00
a

Abb. 46


b
log p50
1,0
7,0
8,0
pH


b
n
6
5
4
3
2
1
nmax
n50
7
8
pH

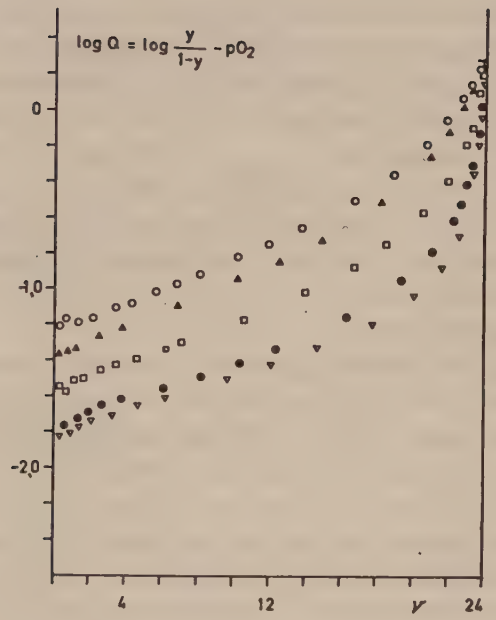


Abb.47

Abb.46a: Hilldiagramm der Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins. Die Sauerstoffbindungskurven wurden bei folgenden pH-Werten in Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+} gewonnen: 7,00 = ▽ ; 7,50 = ● ; 7,80 = □ ; 8,05 = ▲ ; 8,20 = ○ ; 0,1 M Tris/HCl, 20°C; c_{Hc} = 1,5 -2,0 mg/ml.
Abb.46b: Halbsättigungsdruck (als log p_{50}) und Kooperativität n_{50}, bzw. $n_{H,max}$ in Abhängigkeit vom pH. Daten wie bei Abb.46.
Abb.47 : Modifiziertes Scatcharddiagramm der Sauerstoffbindungskurven in Abhängigkeit vom pH. Daten wie in Abb.46.

Es zeigt sich - wie schon in den Untersuchungen von Loewe (1978) - eine starke Abhängigkeit des p_{50}, n_H und $n_{H,max}$ vom pH-Wert:
Mit zunehmendem pH nimmt die Affinität zu. Der Bohreffekt erreicht einen maximalen Wert von $\log p_{50} / pH = -1.1$ zwischen pH 8,0 und 8,2 (Abb.46b). Die Kooperativität steigt von 7,0 ab mit zunehmenden pH und fällt nach Erreichen eines Maximums von $n_{H,max} = 5,65$ bei pH 8,05 wieder ab (Abb.46b). Zu bemerken ist, daß $n_{H,max}$ größere Werte annimmt als n_H. Die größte Kooperativität liegt bei ca. 80%-iger Beladung des Hämocyanins mit Sauerstoff vor; das bedeutet, daß 18 - 21 von 24 Untereinheiten schon Sauerstoff gebunden haben. (Tab.15).
Im Hill - Diagramm nähern sich die Kurven bei hohem pO_2 einer Asymptote, die die Abszisse bei $\log p_{diss,R} = -0,3$ schneidet; bei niedrigen pO_2 -Werten ist die Asymptote meist nicht eindeutig zu gewinnen. ($\log p_{diss,T}$ ist wahrscheinlich 1,6). Mit Hilfe der modifizierten Scatchard-Plots kann man festellen, ob die Bindungskurven bei verschiedenen pH-Werten im Hill - Diagramm die gleichen Asymptoten besitzen. Abb47. zeigt, daß der $p_{diss,R}$ -Wert pH-unabhängig ist, der $p_{diss,T}$ -Wert aber vom pH abhängt. Die Ergebnisse zeigen einen qualitativ ähnlichen Verlauf, wie die von Loewe (1978) in Abwesenheit von Mg^{2+} und Ca^{2+} bei 25°C gewonnenen Werte. Die Werte sind auch quantitativ vergleichbar, wenn man den Unterschied in der Versuchstemperatur von 20°C bzw. 25°C berücksichtigt. Allerdings ist $p_{diss,T}$ in Gegenwart von Mg^{2+} und Ca^{2+} vom pH abhängig, während dies in deren Abwesenheit nicht der Fall ist (Loewe 1978): der Wert für $p_{diss,R}$ = 0,5 Torr ist mit dem von Loewe (1978) ermittelten 0,37 Torr gut vergleichbar.
In alkalischen Bereichen, hier bei pH 9,6, 0,05 M Glycin/NaOH-Puffer, kann man das 37 S-Hämocyanin durch die Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+} vollständig sta-

Tab.15: Daten zur Sauerstoffbindung von 37 S-Hämocyanin in Abhängigkeit vom pH. 0,1 M Tris/HCl für pH 7,0-8,2 und 0,05 M Glycin/NaOH für pH 9,6; T = 20,0 °C 1 mM Mg^{2+}, 4 mM Ca^{2+}; c_{Hc} = 0,1-0,2 mg/ml; Mittelwert von jeweils 2 Messungen

pH	p_{50} (Torr)	n_{50}	n_{max}	Y (bei n_{max})	$p_{diss,T}$ (Torr)	$K_{ass,T}$ (10^{+6} M^{-1})	c*	$\Delta G = RT \ln c$ (kcal/mol)
7,00	28,18	1,70	2,06	78	56,23	0,0098	0,0089	-2,741
7,50	21,88	2,20	3,75	81	56,23	0,0098	0,0089	-2,741
7,80	12,59	2,40	4,50	86	35,23	0, 155	o,0141	-2,474
8,05	8,32	3,35	5,65	88	23,99	O 0229	0,0208	-2,229
8,20	5,37	3,00	3,95	81	17,78	0,0309	O 0281	-2,072
9,6	1,62	5,50	5,50	50	50,12	0,0110	0,00676	-2,900

* $p_{diss,R}$ = 0,500 Torr (für pH 7,0-8,2) und 0,339 Torr (für pH 9,6)

$K_{ass,T}$ = Assoziationsgleichgewichtskonstante für das erste Sauerstoffmolekül

bilisieren. Die Kooperativität ist mit $n_{H,max}$ = 5,5 noch überraschend hoch; die Affinität mit p_{50} = 1,6 Torr (2 Versuche) ist größer als die für die entsprechenden isolierten Untereinheiten (Abb.48). $p_{diss,R}$ und $p_{diss,T}$ ergeben sich zu 0,339 bzw 50,119 Torr (Abb.48). Der Wert für c = 0,00676 liegt in der Größenordnung, wie er für die anderen untersuchten pH-Werten gefunden wurde.

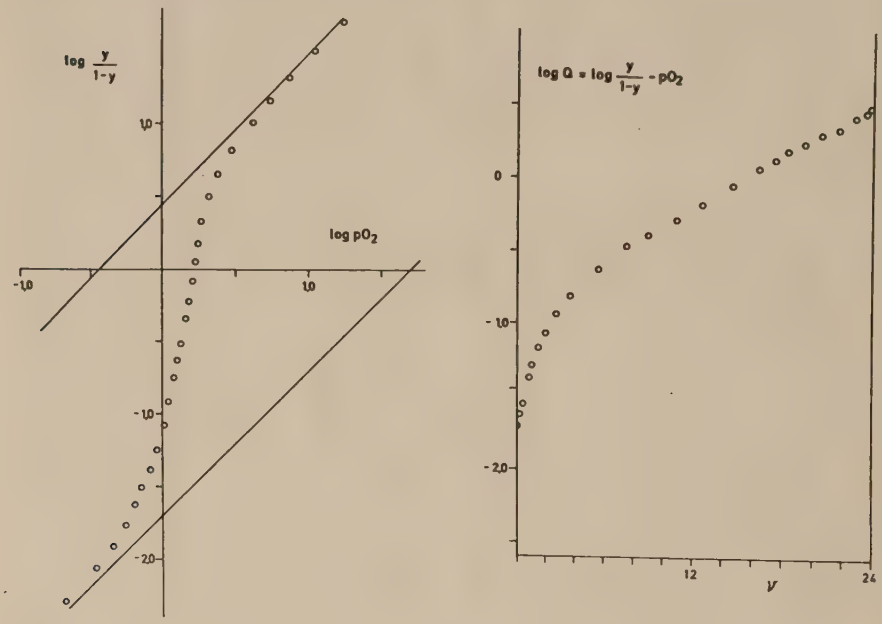


Abb.48: Hilldiagramm und modifiziertes Scatcharddiagramm der Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins bei pH 9,6 in Gegenwart von 1mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+}.
Glycin/NaOH-Puffer, I = 0,05; c_{Hc} = 0,15 mg/ml

13.2. Einfluß der Temperatur

Als weiterer Parameter wurde die Temperatur untersucht. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der pH des Tris/HCl-Puffers stark temperaturabhängig ist. (Abb.49).

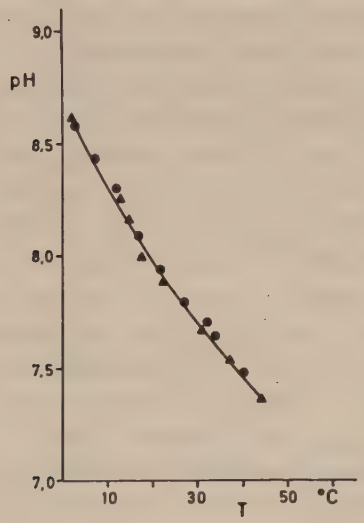


Abb.49: pH-Abhängigkeit des Tris/HCl-Puffers (I = 0,1) von der Temperatur.
Der pH des Puffers wurde bei 20,0°C auf 8,00 eingestellt und bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Es wurden 2 Meßreihen durchgeführt.

Deshalb wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt: a) Der pH wurde bei den jeweils verwendeten Temperaturen konstant auf 8,00 gehalten. b) Der pH wurde auf 8,00 bei 20,0°C eingestellt und bei den einzelnen Temperaturen nicht weiter korrigiert. Dies hatte eine pH-Verschiebung

zur Folge, erlaubte aber eine Abschätzung, inwieweit Temperaturveränderungen das Verhalten des Hämocyanins in vivo beeinflussen könnten.

Zu a) Es wurde von einem 0,1 M Tris/HCl-Puffer mit pH 8,00 (T = 20,0°C) ausgegangen und der pH durch Zugabe von 0,1 M Tris/HCl-Puffer mit 7,0 bzw. 8,5 in einer thermostatisierten Küvette jeweils auf pH 8,00 eingestellt. Die Endkonzentration des Hämocyanins lag bei 0,05 - 0,2 mg/ml. Die Proben wurden vor der Messung ca. 3 h lang bei der jeweiligen Untersuchungstemperatur gehalten. Die Ergebnisse sind in Abb.50 und Tab.16 zusammengefaßt. Der p_{50} = 2,7 Torr bei 3,5°C verzehnfacht sich mit zunehmender Temperatur auf p_{50} = 27,5 Torr bei 40°C. Die Kooperativität von n_{50}= 2,5 - 3,0 (bei 3,5°C) steigt auf ca. 7 (bei 30°C) und fällt bei 40°C wieder geringfügig ab. (Abb.50) Wie bei der pH-Abhängigkeit ist wieder zwischen n_H und $n_{H,max}$ zu differenzieren. Während der n_{50} bis 14,5°C mit 3,3 gering ist und dann auf 6,6 (bei 20° C) nahezu sprunghaft ansteigt, ist die Zunahme des $n_{H,max}$ fast kontinuierlich (Abb.50). Die " innere " Dissoziationskonstanten für den T Zustand sind temperaturabhängig, für den R Zustand nicht. (Abb.51 , Tab.16)

Zu b) Es wurde von einem 0,1 M Tris/HCl Puffer pH 8,00 bei 20°C ausgegangen. Die Hämocyaninkonzentration betrug ca. 0,1 - 0,2 mg/ml. Der pH wurde nach der Ermittlung der Desoxygenierungskurve mit Hilfe einer Mikro-pH- Elektrode in der Meßküvette unter den entsprechenden Versuchsbedingungen ermittelt. Die gewonnenen pH Werte waren mit den entsprechenden Werten des Puffers (Abb.49) identisch. Das Hämocyanin besitzt bei dieser niedrigen Proteinkonzentration keine Pufferfunktion.

Auffällig ist die " Konstanz " der Kooperativität n_H mit Werten von ca. 6 - 7 (Abb.52 , Tab. 17). In diesen Fall repräsentiert der n_H -Wert auch den maximalen Wert

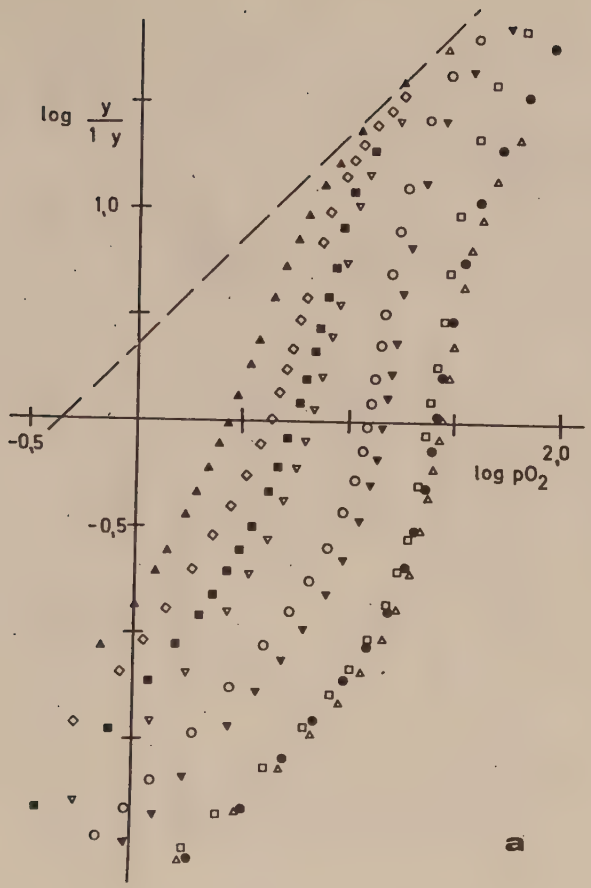
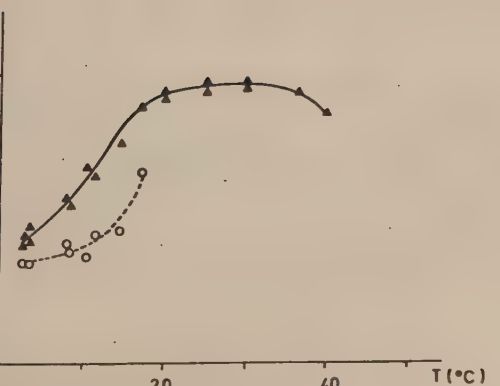
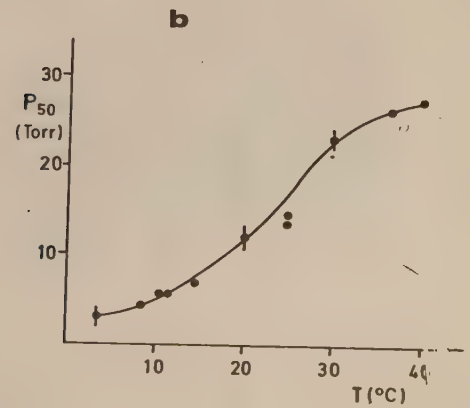


Abb.50

b



b



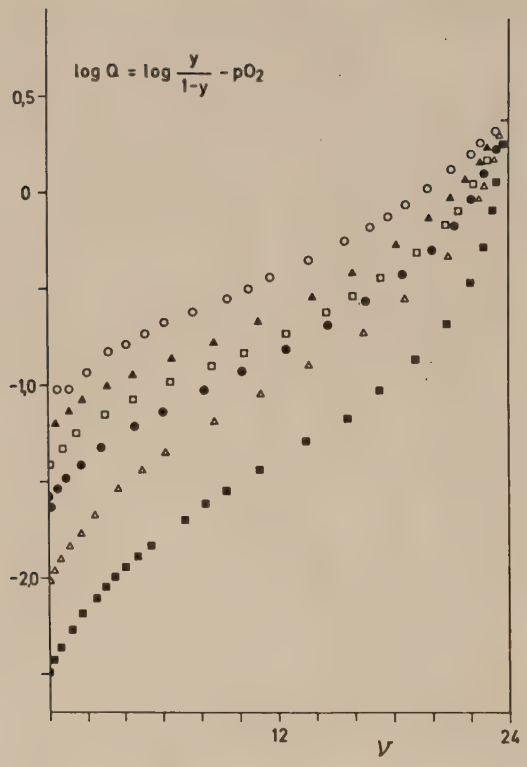


Abb.51

Abb.50a: Hilldiagramm der Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins in Abhängigkeit von verschiedenen Temperaturen. Der pH betrug immer 8,00; Tris/HCl-Puffer (I = 0,1); c_{Hc} = 0,15 - 20 mg/ml.Die Temperaturen: ▲ = 3,5°C, ◇ = 8,5°C, ■ = 11,5°C, ▽ = 15,5°C, ○ = 20,0°C, ▼ = 25,0°C, □ = 30,0°C, ● = 36,5°C, △ = 40,0°C.

Abb.50b: Halbsättigungsdrucke p_{50} (in Torr) und Kooperativität n_{50}, bzw. $n_{h\,max}$ in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstantem pH = 8,00 **(siehe Tab.16)**.

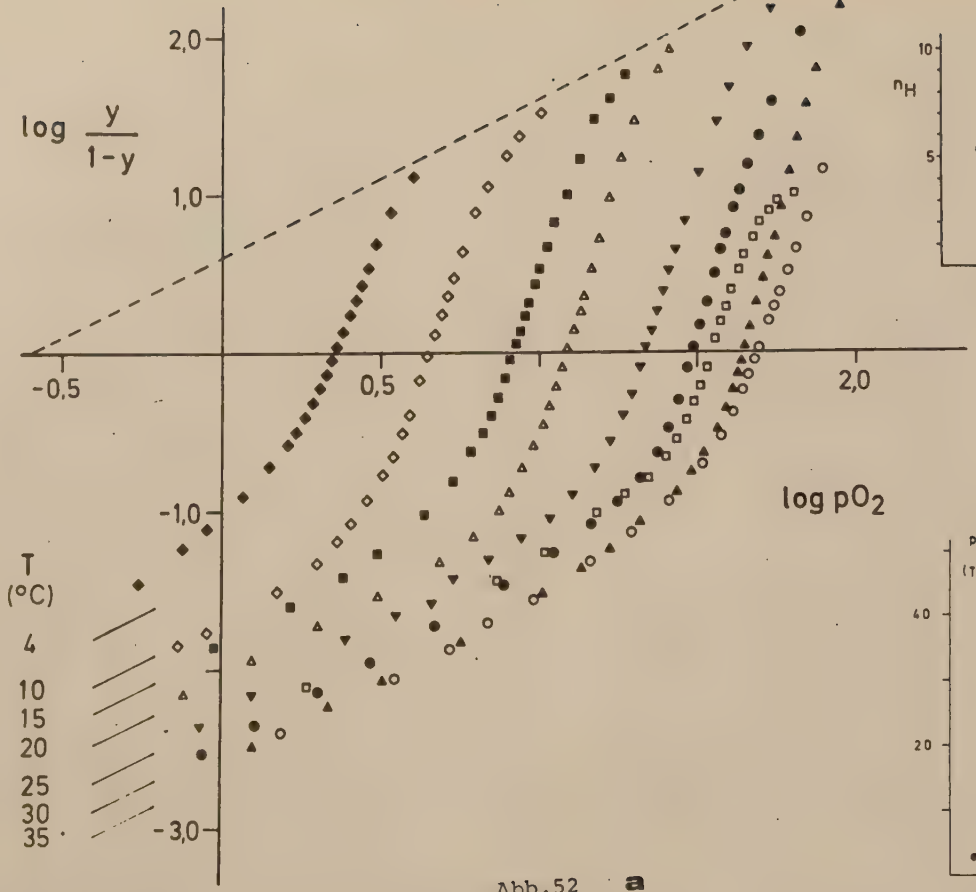
Abb.51: Modifiziertes Scatcharddiagramm der Sauerstoffbindungskurven in Abhängigkeit von der Temperatur bei konstantem pH = 8,00. Daten wie bei Abb.50 .

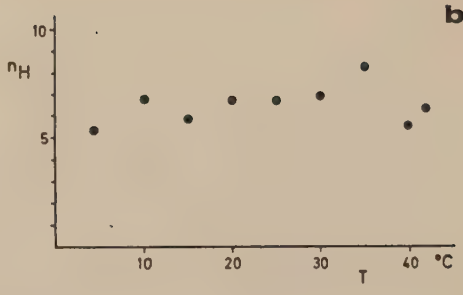
Die Temperaturen: ○ = 3,5°C, ▲ = 8,5°C, □ = 11,5°C, ● = 14,5°C △ = 20,0°C, ■ = 30,0°C,

Tab.16: Daten zur Sauerstoffbindung von 37 S-Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur.
Fall a) Der pH-Wert betrug bei allen Messungen 8,00.
Tris/HCl-Puffer (I = 0,1), c_{Hc} = 0,15 mg/ml, wenn nicht anders angegeben wird, dann stellen die Werte Mittelwerte aus jeweils 2 Messungen dar.

T (oC)	p_{50} (Torr)	n_{50}	n_{max}	y (bei n_{max})	$p_{diss,T}$ (Torr)	c*	ΔG_I (kcal/mol)	$\Delta G_{I,T}$ (kcal/mol)	N (nach Buc et al., 1973)
3,5 (n=5)	3,16±0,65	2,42	3,04±0,19	0,78	12,59	0,03550	-1,829	-5,646	4,7
8,5	4,37	2,71	3,77	0,76	17,78	0,02510	-2,055	-5,628	6,3
11,5	5,56	3,12	4,52	0,72	26,92	0,01660	-2,310	-5,491	6,9
14,5	6,92	3,20	5,30	0,68	42,66	0,01050	-2,595	-5,336	7,5
20,0 (n=7)	11,87±0,96	--	6,05±0,31	0,50	104,71	0,0043	-3,163	-4,972	7,6
25,0	14,29	--	6,40	0,50	158,49	0,00282	-3,466	-4,873	7,7
30,0 (n=5)	23,86±1,42	--	6,43±0,32	0,50	316,23	0,00141	-3,939	-4,582	7,21
36,5	26,30	--	6,60	0,50	501,19	0,00089	-4,305	-4,452	7,31
40,0	27,54	--	6,05	0,50	--	--	--	--	--

*$p_{diss,R}$ = 0,450 Torr


log y/(1-y)
2,0
1,0
-1,0
-3,0
-0,5
0,5
2,0
log pO2
T (°C)
4
10
15
20
25
30
35


b
n_H
10
5
10
20
30
40 °C
T

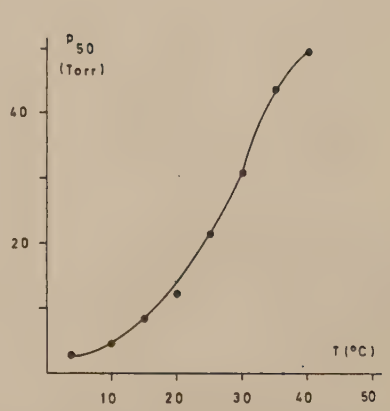

b
P_{50} (Torr)
40
20
T (°C)
10
20
30
40
50

Abb.52 **a**

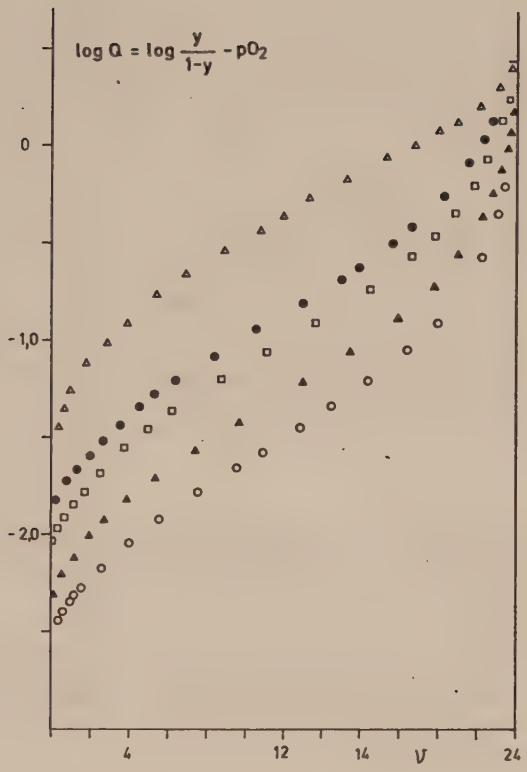


Abb.53

Abb.52a: Hilldiagramm der Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins in Abhängigkeit von verschiedenen Temperaturen bei nicht konstantem pH. Der pH wurde bei T = 20°C auf 8,00 eingestellt und änderte sich bei den einzelnen Temperaturen dem pH-Gang des Tris/HCl-Puffers entsprechend (vgl. Abb.49); c_{Hc} = 0,15 - 0,20 mg/ml.

Abb.52b: Halbsättigungsdruck p_{50} (in Torr) und Kooperativität $n_{50} = n_{H,max}$ in Abhängigkeit von der Temperatur bei nichtkonstanten pH.

Abb.53: Modifiziertes Scatcharddiagramm der Sauerstoffbindungskurven in Abhängigkeit von der Temperatur bei nichtkonstantem pH. Daten wie bei Abb.52.

Temperaturen: △ = 4°C, ● = 15°C, □ = 20°C, ▲ = 25°C, ○ = 30°C.

Abb.17: Daten zur Sauerstoffbindung von 37 S-Hämocyanin in Abhängigkeit von der Temperatur. Fallb) Der pH der Hämocyaninlösung betrug 8,00 bei 20,0°C und wurde für die einzelnen Versuchstemperaturen nicht nachkorrigiert.
Tris/HCl-Puffer (I = 0,1), c_{Hc} = 0,15 mg/ml; es werden Mittelwerte von jeweils 2 Messungen angegeben.

T (°C)	p_{50} (Torr)	n_{50} (=n_{max})	$p_{diss,T}$ (Torr)	c^a	ΔG_I (kcal/mol)	$\Delta G_{I,T}$ (kcal/mol)	N (nach Buc et al., 1973)
4	2,29	5,16	25,12	0,01413	-2,337	-5,288	7,7
10	4,47	6,10	50,12	0,00708	-2,776	-5,102	8,25
15	8,51	5,90	72,44	0,00490	-3,034	-5,045	8,5
20	12,30	6,60	117,49	0,00302	-3,368	-4,905	8,0
25	21,38	6,64	208,93	0,00170	-3,765	-4,709	7,6
30	30,90	6,94	316,23	0,00112	-4,077	-4,582	7,8
35	43,65	7,90	446,68	0,00079	-4,355	-4,497	8,7
40	48,98	6,10	446,68	0,00079	-4,426	-4,597	6,7
42	35,48	6,12	x	x	x	x	x

a) $p_{diss,R}$ = 0,355 Torr

x) nicht bestimmt

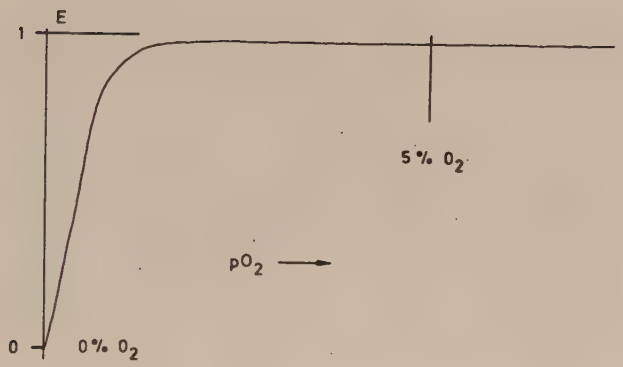
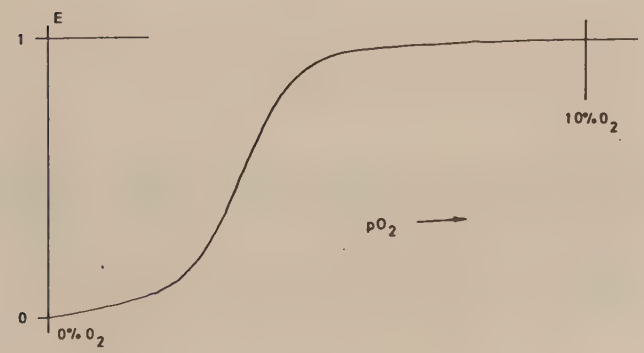


Abb.54: Sauerstoffbindungskurve des 37 S-Hämocyanins bei T = 3,5°C, pH 8,00 (siehe Tab.16); c_{Hc} = 0,1 mg/ml.

Abb.55: Sauerstoffbindungskurve des 37 S-Hämocyanins bei T = 30°C; der pH der Lösung betrug 8,00 bei T = 20°C, wurde jedoch für die Versuchstemperatur nicht nachkorrigiert (siehe auch Tab.17); c_{Hc} = 0,15 mg/ml



Die Affinität verläuft bis 20°C ähnlich wie im Fall a) und fällt dann stark ab (Abb.52). Auch hier ist der $p_{diss,R}$-Wert temperaturabhängig, $p_{diss,T}$ hingegen nicht (Abb.53).

Das Verhalten von c ist in beiden Fällen qualitativ vergleichbar. Bei tieferen Temperaturen (3 - 4°C) ist c um ca. 20 fach niedriger als bei hohen Temperaturen (40°C) Die freie Energie der Kooperativität verdoppelt sich bei der Temperaturerhöhung von 3,5°C bzw. 4°C auf 40°C. Die Bindungsenthalpie, die sich aus der Steigung im van't Hoff Diagramm (log p_{50} vs.1/T) ergibt, beträgt für Fall a) 34,093 kcal/mol und für Fall b) 19,058 kcal/mol (Abb.56).

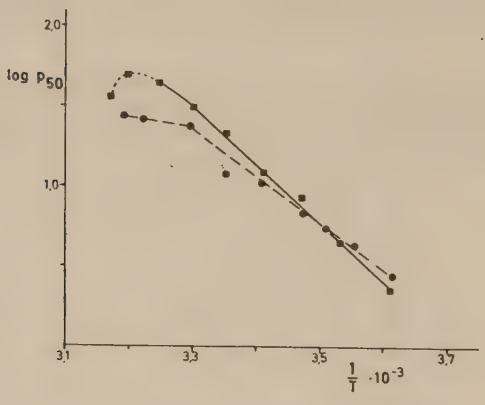


Abb.56: Logarithmische Auftragung der Halbsättigungsdrucke des 37 S-Hämocyanins gegen die reziproke absolute Temperatur (van't Hoff-Diagramm);
Fall a) ● = der pH betrug bei allen Temperaturen 8,0,
Fall b) ■ = der pH der Lösung wurde bei T = 20,0°C auf 8,0 eingestellt und für die untersuchten Temperaturen nicht korrigiert.

In beiden Fällen ergibt sich auch ein qualitativ ähnliches Verhalten für die Dissoziationskonstanten $P_{diss,T}$ des T Zustandes. Sie erhöhen sich mit zunehmender Temperatur von 12 bzw. 25 Torr bei 3,5°C bzw. 4°C auf 501 bzw. 446 Torr bei 40°C. Die Bindungsenthalpie ΔH = 31.185 kcal/mol ist für Fall a) doppelt so groß wie im Fall b), ΔH = 16,084 kcal/mol. Die daraus kalkulierten Entropieänderungen ergeben sich bei 20°C zu ΔS = +78,9 (für Fall a), bzw. ΔS = +38,2 cal/mol grd (für Fall b),(Abb.58).

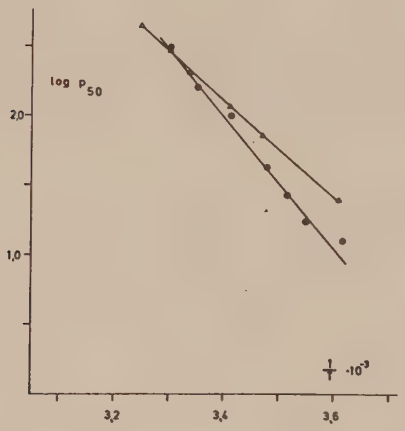


Abb.57: Logarithmische Auftragung der Dissoziationskonstanten $P_{diss,T}$ gegen die reziproke absolute Temperatur (van't Hoff-Diagramm);

Fall a) Δ = der pH betrug bei allen Temperaturen 8,0,
Fall b) ● = der pH der Lösung wurde bei T = 20,0°C auf 8,0 eingestellt und für die untersuchten Temperaturen nicht korrigiert.

13.3. Einfluß von Chloridionen

Der Einfluß von NaCl auf die Sauerstoffbindung ist in Abb.58 dargestellt. Die Affinität nimmt bis 1 M NaCl geringfügig zu, bei 2 - 3 M NaCl erreicht sie wieder den ursprünglichen Wert. Eine signifikante Kooperativitätsveränderung, vgl. mit Referenzproben, ist nicht zu erkennen. Der T und R Zustand wird davon nicht berührt.

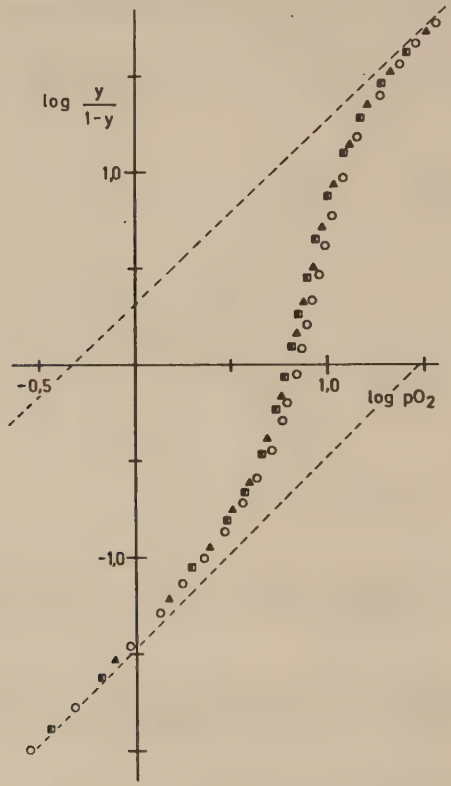


Abb.58 . Hill-Diagramm zu den Sauerstoffbindungskurven des 37 S-Hämocyanins in Abhängigkeit von NaCl.
○ = 0 M; ▲ = 0,5 M; ◧ = 3,0 M;
0,1 M Tris/HCl, pH 8,0, 20°C, c_{Hc} = 0,15 mg/ml.

13.4. Einfluß verschiedener Metaboliten

Von großem Interesse ist der Einfluß von Metaboliten auf die Sauerstoffbindung eines respiratorischen Pigments. Beim Hämoglobin spielt 2,3-Diphosphoglycerat (DPG) eine gewichtige Rolle. Da Hämocyanin im Gegensatz zu Hämoglobin in der Hämolyphe frei gelöst ist, sollte DPG wohl keinen oder einen untergeordneten Effekt haben. Dagegen wäre ein Einfluß anderer Metaboliten, wie z.B. anaerobe Abbauprodukte, denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit sollen nur Succinat und Malat behandelt werden.

a) DPG:Die Ergebnisse werden in Abb.59 und Tab.18 aufgeführt. Bis zu einer Konzentration von 1 mM DPG ergibt sich keine Abweichung der Bindungseigenschaften gegenüber der des unbehandelten 37 S-Hämocyanins.

b) Succinat: Die Ergebnisse zeigen Abb.58 und Tab.18. Succinat hat einen deutlichen Einfluß auf Affinität und Kooperativität. Eine Konzentration von 1 mM verändert die Bindungseigenschaften des 37 S-Hämocyanins nicht nennenswert. Jedoch nimmt bei 5 mM Succinat der p_{50} um ca. 19% auf 8,32 Torr ab; ebenso ist eine deutliche Abnahme der Kooperativität von 5,6 auf 3,9 zu sehen. Eine Erhöhung der Succinatkonzentration auf 100 mM erhöht die Affinität um ca. das 5-fache auf p_{50} = 2,2 Torr, während die Kooperativität sich auf ca. die Hälfte (n_H = 2,8) verglichen mit der unbehandelten Referenzprobe (n_H = 5,6), erniedrigt. Interessant ist das Verhalten der Bindungskurven bei der Auftragung im Hill - Diagramm. Der T-Zustand ist von der Succinatkonzentration abhängig. Die Wechselwirkungsenergie für die Interaktion der verschiedenen Untereinheiten wird also mit zunehmender Succinatkonzentration kleiner.

Der Einfluß von Succinat auf den Aggregationszustand wurde nicht untersucht.

c) Malat: Hierzu liegt nur ein einzelner Versuch vor, mit einer Konzentration von 1 mM. Sauerstoffaffinität und Kooperativität wurden dadurch nicht beeinflußt.

Tab. 18 : Einfluß von Malat, 2,3-Diphosphoglycerat und Succinat auf die Sauerstoffbindungseigenschaft von 37 S-Hämocyanin. 0,1 M Tris/HCl, T = 20,0 °C, c_{Hc} = 0,15 mg/ml.

Metabolit	Konzentration	pH	p_{50} (Torr)	n_{50}	n_{max}	$\log p_{diss,T}$	$\log p_{diss,R}$
Malat n = 2	1 mM	8,18	6,30	2,60	4,36	1,2	- 0,3
2,3-DPG n = 2	1 mM	8,18	5,62	2,44	4,62	1,2	- 0,3
	0,001 mM	8,18	6,17	2,36	4,57	1,2	- 0,3
37 S-Hc Referenz	-	8,18	6,31	2,36	4,60	1,2	- 0,3
Succinat n = 2	1 mM	8,00	10,00	2,51	5,37	1,4	- 0,29
	5 mM	8,00	8,32	2,00	3,87	1,15	- 0,29
"	100 mM	8,00	2,19	2,00	2,88	0,55	- 0,29
37 S-Hc Referenz	-	8,00	10,23	2,75	5,64	1,4	- 0,29

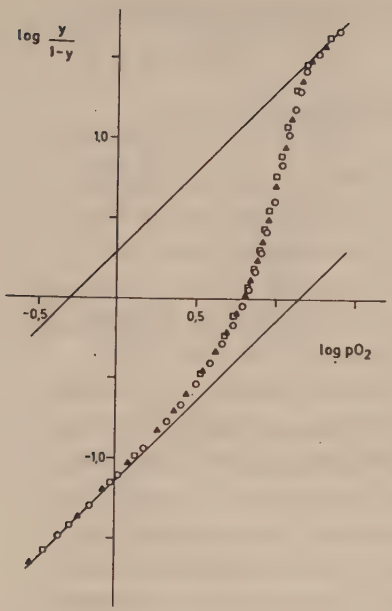


Abb.59: Hill-Diagramm zu den Sauerstoffbindungskurven des 37 S-Hämocyanins in Abhängigkeit von 2,3-Diphosphoglycerat
□ = 0,001 mM; ▲ = 1,0 mM
○ = unbehandelte Probe

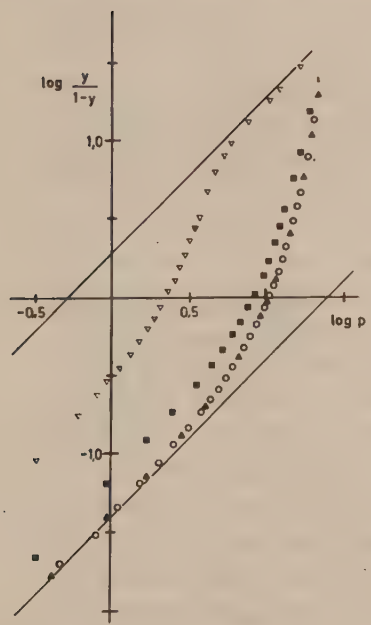


Abb.60 : Hill-Diagramm zu den Sauerstoffbindungskurven des 37 S-Hämocyanins in Abhängigkeit von Succinat.
▲ = 1 mM; ■ = 5 mM;
▽ = 100mM; ○ = unbehandelte Probe.
0,1 M Tris/HCl, pH 8,00 , 20°C, c_{Hc} = 2 mg/ml.

14. Der Einfluß der limitierten Proteolyse auf die Sauerstoffbindung (*)

14.1. Einfluß auf die einzelnen Untereinheiten

Nachdem Versuche von Strych (1981) zur limitierten Spaltung von Untereinheiten des Hämocyanins aus Eurypelma gezeigt hatten, daß die Bruchstücke ohne Denaturierung nicht voneinander getrennt werden können, war es von Interesse, ob auch die reversible Bindung des Sauerstoffs noch erhalten bleibt, und wenn ja, inwieweit sie verändert ist. Dazu wurden die einzelnen Untereinheiten mit Trypsin inkubiert und die Reaktion nach 90, 120 und 210 Minuten mit einem Inhibitor abgestoppt (Strych, 1981). Von diesen Proben wurden Sauerstoffbindungskurven angefertigt. Nach jeder Messung wurde der pH der Probe überprüft. Alle Untereinheiten binden selbst nach 3 1/2 - stündiger Trypsinbehandlung noch reversibel Sauerstoff (Tab.19 ; Abb.61, Abb.62).

Tab.19a: Verhältnis der Absorptionsmaxima bei 340 nm und 280 nm der einzelnen Untereinheiten nach 210 Minuten Spaltdauer mit Trypsin in 0,1 M $(NH_4)HCO_3$-Puffer, pH 8,0, T = 20°C; $E_{280\ nm} = 1$

Spaltzeit (Minuten) / Untereinheiten	0	210	relative Sauerstoffbindungskapazität nach 210 min (%)
a	0,23	0,17	74
a/g	0,19	0,15	79
bc	0,17	0,12	71
d	0,32	0,28	88
e	0,20	0,14	70
f	0,22	0,21	96

(*) siehe auch Strych, Dissertation, 1981

Tab.19b: Halbsättigungsdrucke (in Torr) der Untereinheiten nach limitierter Trypsinolyse (Inkubationsdauer 0, 90 und 120 bzw. 210 min.). 0,1 M $(NH_4)HCO_3$-Puffer, pH 8,0, T = 20°C c_{Hc} = 0,15 mg/ml.

Untereinheit	Spaltdauer 0 min	90 min	120§ bzw. 210 min
a	5,9	5,5	4,0
d	3,2	3,3	3,4
e	4,6	3,2	-
f	4,7	4,6	4,7§
a/g	5,9	5,0	-
bc	8,3	6,2	6,9

Die p_{50}-Werte liegen zwischen 3 und 6 Torr und für das Heterodimer bc bei 8 Torr (Tab.19b). Dies entspricht den Werten, die nach Dialyse gegen 0,1 M Tris/HCl und 0,05 M Glycin/NaOH-Puffer zwischen pH 6,5 -9,6 (siehe Punkt C.10) gefunden wurden. Man kann eine leichte Abnahme des p_{50} mit zunehmender Spaltdauer erkennen. Der Hillkoeffizient liegt erwartungsgemäß bei 1,0 ± 0,1. Das Verhältnis E_{340}/E_{280} (als relatives Maß der O_2-Bindungskapazität) ist nach 210 Minuten Spaltzeit größer (Tab.19a), d.h. ein Teil (6 - 32%) der aktiven Zentren ist inaktiviert. Von Interesse ist das sehr unterschiedliche Verhalten der einzelnen Untereinheiten: Während die Untereinheiten d und f nach 210 Minuten noch 88% bzw. 96% ihrer Bindungskapazität aufwiesen, betrug sie bei e und bc nur noch 70% bzw. 71%. Interessanterweise ist dabei auch die Abnahme des p_{50} von e und bc relativ groß: Der p_{50} nahm bei e nach 90 Minuten Trypsineinwirkung um ca. 30% von 4,6 Torr auf 3,2 Torr ab, bei bc um 25% von 8,3 Torr auf 6,2 Torr. Andererseits bleibt die Affinität bei f und d, bei f sogar nach 210 Minuten Spaltzeit, konstant. Erstaunlich ist, daß d, obwohl es fast quantitativ gespalten ist, Sauerstoff reversibel zu binden vermag (Abb.61).
Zu bemerken ist, daß die am Heterodimer beteiligten Untereinheiten b und c als Einzelketten nach 210 Minuten Spaltzeit wie d fast quantitativ gespalten sind, und Sauerstoff nicht mehr zu binden vermögen. Das Heterodimer vermag dies jedoch.

Abb.61: Sauerstoffbindungskurve der Untereinheit e nach limitierter Trypsinolyse (Inkubationszeit 210 Min.)
0,1 M $(NH_4)HCO_3$-Puffer, pH 8,0, 20°C, c_{Hc} = 0,8 mg/ml.

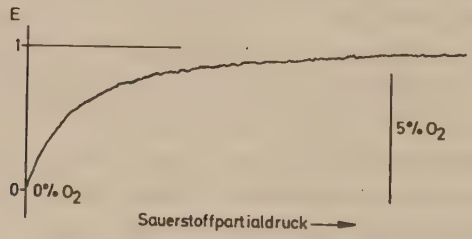
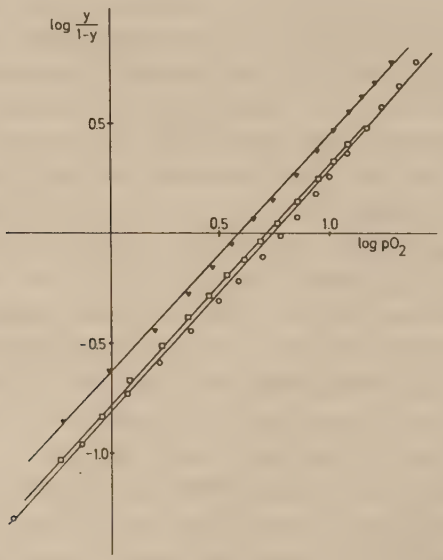


Abb.62:Hill-Diagramm der Sauerstoffbindungskurven der Untereinheit a nach 0 (o), 90 (□) und 210 (▽)-minütiger Inkubation.



14.2. Einfluß auf das 37 S-Hämocyanin

Die Aussagen über die Sauerstoffbindung des "nativ" gespaltenen Hämocyanins sind mit einer Unsicherheit behaftet. Da verschiedene Untereinheiten, vor allem d, sehr schnell herausbrechen, und das Oligomer dann rasch weiter zerfällt, muß man annehmen, daß man Sauerstoffbindungskurven nicht von molekulareinheitlichen Aggregaten gewinnt.
Die Affinität (Abb. 63) nimmt mit zunehmender Dauer der Trypsinolyse zu und nähert sich Werten, wie sie für die Untereinheiten gefunden wurden (Abb. 42). Dies ist sicher teilweise dadurch zu erklären, daß immer mehr Untereinheiten frei vorliegen. Zur gleichen Zeit nimmt $n_H = 4$ auf 1 ab, d.h. die Kooperativität geht verloren (Abb. 64, Tab. 20).
Einzelne Fraktionen wurden nach säulengelchromatographischer Trennung im 0,1 M $(NH_4)HCO_3$-Puffer, pH 8,0, untersucht. Für Fraktion Nr. 50 (= Gipfel I in Abb.37) wurde ein p_{50} von 9,3 Torr und n_H von 1,3, für Fraktion Nr. 62 (= Gipfel II in Abb.37) ein p_{50} von 5,9 Torr und n_H von ca. 1,0

Tab. 20: Halbsättigungsdrucke (im Torr) und Hillkoeffizienten von 37 S-Hämocyanin nach unterschiedlich langer limitierter Trypsinolyse in 0,1 M $(NH_4)HCO_3$-Puffer pH 8,0, T = 20,0°C, c_{Hc} = 0,8 - 2,0 mg/ml.
Es wurden Gesamtgemische untersucht.

Spaltzeit (min.)	0		90		210	
Versuche	p_{50}	n_{50}	p_{50}	n_{50}	p_{50}	n_{50}
I	15,5	3,7	-	-	5,8	0,8
II	10,4	3,4	-	-	3,6	1,1
III	14,5	4,4	8,3	2,8	4,5	1,7
IV	7,2	4,2	6,5	2,2	4,3	2,4

I nach Spaltung und Isolierung über 0,1 M Tris/HCl pH 7,5
II nach Spaltung und Isolirung über 0,1 M $(NH_4)HCO_3$ pH 8,0
III und IV verschiedene Hämocyaninproben

ermittelt. Der niedere n_H = 1,3 von Gipfel I kann durch fortschreitende Schägigung des 37 S-Hämocyanins (z. B. auch während der Isolierung) erklärt werden.

Abb. 63: Sauerstoffbindungskurve von 37 S-Hämocyanin nach limitierter Proteolyse mit Trypsin (Inkubationszeit 210 min.); 0,1 M $((NH_4)HCO_3$-Puffer, pH 8,0, 20°C, c_{Hc} = 1,0 mg/ml.

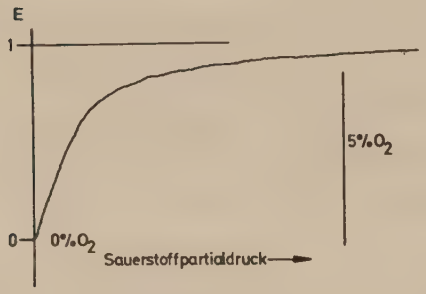
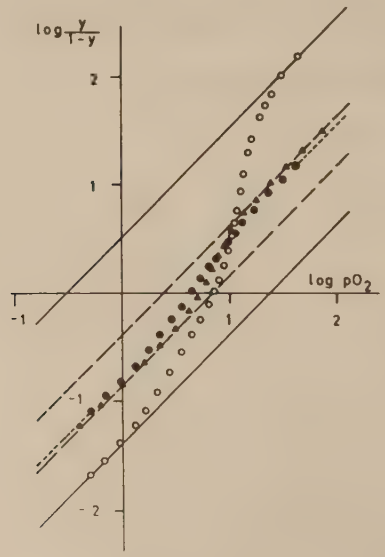


Abb. 64: Hill-Diagramm der Sauerstoffbindungskurven von 37 S-Hämocyanin nach 0 (o), 90 (▲) und 210 (●)-minütiger Inkubation mit Trypsin. Bedingungen wie bei Abb. 63.



15. Funktionelle Charkterisierung von Reassoziationsprodukten

Die besonderen Eigenschaften des nativen 37 S-Hämocyanins - niedrige Affinität, ausgeprägter Bohreffekt und Kooperativität - können mit den Eigenschaften der isolierten Untereinheiten - hohe Affinität, kein Bohreffekt, und keine Kooperativität - nicht ohne weiteres erklärt werden, zumal sich auch die einzelnen Untereinheiten untereinander funktionell nicht unterscheiden. Die Vermutung lag sehr nahe, daß die einzelnen Untereinheiten erst innerhalb eines Molekülkomplexes die neuen Eigenschaften erbringen können. Funktionelle Studien an isolierten Reassoziationsprodukten erschienen deshalb sinnvoll.

Die Gewinnung der einzelnen Reassoziate wurde oben (unter C.5.) beschrieben. Nach Aufnahme der Sauerstoffbindungskurven wurde in der Regel die Stabilität des Aggregats durch Sedimentationsläufe überprüft. Die gemessenen Daten kamen nur dann zur Auswertung, wenn die Intaktheit der Proben gegeben war.
Vorweg wurde geprüft, in wieweit die Gegenwart von Ca^{2+} bei der Reassoziation einen Einfluß auf die Sauerstoffbindungsfunktion hat. Dazu wurde 37 S-Hämocyanin dissoziiert, und dann in Ab- bzw. in Anwesenheit von 5 mM Ca^{2+} reassoziiert. Ca^{2+} hat keinen Einfluß auf die Funktion (Tab.21,Nr.3,7). Dies gilt auch dann, wenn reassoziiertem 37 S-Hämocyanin, das in Abwesenheit von Ca^{2+} aufgebaut wurde, 5 mM Ca^{2+} zugegeben wird (Tab.21,Nr.7). Die Affinität des reassoziierten 37 S-Hämocyanins ist mit p_{50}= 2,2 - 3,3 Torr doppelt so hoch wie die der Untereinheiten (Tab.21,Nr.1-8). und sogar 3-4 mal so hoch, verglichen mit dem undissoziierten 37 S-Hämocyanin.
Die Kooperativität ist mit n_H= 1,6 - 2,0 signifikant größer als 1.
Beim Studium der funktionellen Werte von Reassoziaten, die durch Mischen von isolierten Untereinheiten gewonnen wurden,

ist zu beachten, daß alle Untereinheiten während ihrer Isolierung wiederholt säulenchromatographisch behandelt und wegen der langen Dauer der Experimente möglicherweise geschädigt worden sind.
Unter den Reassoziationsprodukten ist von besonderem Interesse das Produkt, das man durch Mischen aller Untereinheiten mit Ausnahme von e erhält (Abb.65 ; Tab.21,Nr.2).
Es ist von der Größenordnung eines 37 S-Hämocyanins, hat die niedrige Affinität wie undissoziiertes 37 S-Hämocyanin, besitzt jedoch keine Kooperativität, $n_{50} = 1$; zwei Meßreihen wurden durchgeführt.

Abb.65: Sauerstoffbindungskurve eines säulengelchromatographisch isolierten Reassoziationsproduktes, das alle Untereinheiten bis auf e enthält (Meßbedingungen siehe Tab.21; Nr.2).

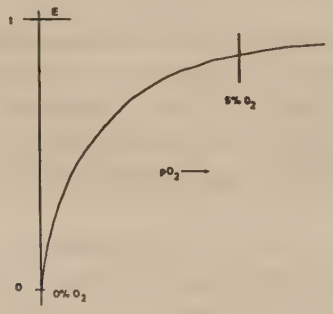
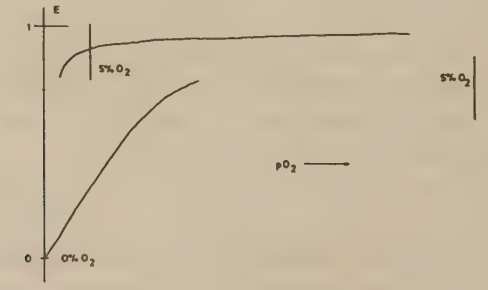


Abb.66:Sauerstoffbindungskurve eines säulengelchromatographisch isolierten Reassoziationsproduktes, das die Größe eines Hexamers bzw. Heptamers besitzt.(siehe Tab.21, Nr.24).



Tab.21: Halbsättigungsdruck p_{50} und Kooperativität n_{50} von isolierten Reassoziationsprodukten. Reassoziationsbedingungen: 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 , T = 20°C, Endkonzentration des Proteingemisches 2-3 mg/ml; wenn nicht anders angegeben, wurde in Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} gearbeitet (die Nummern entsprechen denen in der Tab.9); Mittelwerte aus jeweils 2 Messungen.
Meßbedingungen: 0,1 Tris/HCl, pH 7,5 , T = 20°C; c_{Hc} = 0,2 mg/ml, der pH 8,0 wurde durch Zugabe von 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,5 , eingestellt.

Nr.	Ausgangsgemisch	pH	p_{50} (Torr)	n_{50}	Anzahl der Untereinheiten a	d	e	f	g	bc	S -Wert unkorrigiert
Gruppe I (4x6):											
1	a+d+f+g+bc(+e)	7,5	11,48	1,00	4,4	4,1	2,1	7,7	3,4	4,0	36.8
2	a+d+f+g+bc	8,0	13,50	1,00	4,2	2,8	-	9,5	3,8	3,7	35,0
3	dissoziiertes 37 S-Hämocyanin §	8,0	3,31	1,92	4,2	5,1	3,6	4,3	3,3	4,0	34,7
7	dissoziiertes 37 S-Hämocyanin	7,5	2,85	1,65	4,3	4,3	3,9	2,0	4,1	4,2	35,1
	"	8,0	2,80	1,95	4,3	4,3	3,9	2,0	4,1	4,2	35,1
	" §§	8,0	2,24	1,67	4,3	4,3	3,9	2,0	4,1	4,2	35,1
8	a+f+g+bc(+d+e)	8,0	4,07	1,27	4,9	1,3	1,0	6,6	3,9	4,0	32,3
Gruppe II (3x6):											
10	a+f+g+bc(+d)	7,5	14,79	1,41	4,0	0,9	-	3,9	5,2	4,0	28.5
11	a+f+g+bc(+d+e)	8,0	5,37	1,07	4,3	0,8	-	5,2	3,6	4,0	26,5

Nr.	Ausgangsgemisch	pH	p_{50} (Torr)	n_{50}	Anzahl der Untereinheiten a	d	e	f	g	bc	S -Wert
Gruppe IV (1x6):											
23	dissoziiertes 37 S-Hämocyanin	8,0	6,03	1,05	1,5	2,1	1,5	1,4	1,0	-	15,2
24	dissoziiertes 37 S-Hämocyanin	8,0	6,31	1,84	0,8	2,0	1,0	1,4	0,7	0,4	15,1
27	a+d+e+f+g+	8,0	6,30	1,05	1,4	1,7	1,3	1,6	1,0	-	14,4
29	f+g(+a+d)	8,0	4,79	1,46	0,5	0,4	-	2,0	2,1	-	13,7
30	a+bc(+d)	7,5	6,76	1,00	2,1	0,2	-	-	-	2,0	9,1
32	d+e+f+g+bc	7,5	10,47	1,44	x	x	x	x	x	x	15,0
	Referenz §§§§	8,0	12,30	6,60	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	36.5§§§

§ Die Isolierung und Messungen wurden in Anwesenheit von 4 mM Ca^{2+} durchgeführt;

§§ Die Isolierung erfolgte in Abwesenheit von Ca^{2+}-Ionen, vor der Messung wurde jedoch die Probe über Nacht gegen 4 m'l Ca^{2+} dialysiert und in ihrer Anwesenheit untersucht.

§§§ aus Schmid, Dissertation, 1976

§§§§ Gemisch aus 15 Tieren.

Ähnliche Reassoziate gewinnt man durch Reassoziation der Kombination a + f + g + bc, die mit etwas d verunreinigt waren. Die Produkte in der Größenordnung von ca. 28 S (≙ 3x6-Struktur) zeichnen sich durch eine sehr ähnliche Zusammensetzung der Untereinheiten aus: a + d + f + g + bc = 4 + 1 + 4 + 5 + 4 bzw. 4 + 1 + 5 + 4 + 4 (Tab.21,Nr.10 und 11). Im ersten Fall beträgt die Kooperativität n_{50} = 1,41 (bei pH 7,5), im zweiten Fall ist sie nicht vorhanden (n_{50} = 1,05 bei pH 8,0).

In einigen Fällen waren isolierte Reassoziate kooperativ, obwohl ihnen die Untereinheit e fehlte; z.B. a + d + e + f + g + bc = 4 + 1 + 0 + 4 + 5 + (2+2), (Tab.21,Nr.10). Überraschend war dann jedoch, daß ein Reassoziat mit nahezu der gleichen Untereinheitenzusammensetzung a + d + e + f + g + bc = 4 + 1 + 0 + 5 + 4 + (2+2), (Tab.21,Nr.11) keine Kooperativität und dazu noch eine doppelt so hohe Affinität zeigte; es wurden jeweils 2 Versuche durchgeführt. Beide Reassoziate unterscheiden sich nur geringfügig hinsichtlich ihres Gehaltes an f und g. Beim Vergleich aller Reassoziate fällt auf, daß diejenigen, die f in größeren Mengen als n_f = 4 enthalten,die Fähigkeit zur Ausbildung einer Kooperativität nur in geringem Maße oder gar nicht besitzen.
Aus allen Versuchen kann man jedoch schließen, daß in jedem Fall ein Reassoziationsprodukt, das größer als ein Hexamer ist, nur dann eine Kooperativität n größer 1 besitzt, wenn Untereinheit bc und meist noch e mit eingebaut ist. Daß e für die Kooperativität bei Hexameren teilweise mitverantwortlich ist, wenn gleichzeitig das Heterodimer bc zugegen ist, kann man aus der Analyse verschiedener Hexamere ableiten (Tab.21, Nr.24). Klar zu erkennen ist auch, daß ein Hexamer keine Kooperativität, n_{50} = 1, besitzt, wenn bc nicht mit eingebaut ist; dabei ist es nicht von Bedeutung, von welchem Ansatz ausgegangen wird (Tab.21,Nr.23 und 27). Ist hingegen bc anwesend, weisen die Hexamere hohe Kooperativitäten auf (n_{50} = 1,8 ; Tab.21,Nr.24; Abb.66).
Fehlt im Reassoziat Untereinheit a (also einem (1x6)-Aggregat so verschiebt sich die Affinität aus dem Bereich der Affinitäten der isolierten Untereinheiten (p_{50} = 5-6 Torr) in den Bereich, der dem undissoziierten Hämocyanin entspricht

(p_{50} = 10 Torr bei pH 7,5-8,0 Tab.21,Nr.32).
Sehr interessant erscheint mir die Funktion eines Reassoziats, das überwiegend aus g + f mit wenig a und e aufgebaut ist (g + f + a + e = 2 + 2 + 0,5 + 0,5), und mit 13,5 S sedimentiert . Es hat die für die Untereinheiten typische Affinität von p_{50} = 4,8 Torr (zwei Versuche), aber eine Kooperativität, die signifikant größer als 1 ist (n_{50} = 1,5, Abb.66). Von Bedeutung ist hier, daß die Untereinheiten bc und d im Gegensatz zu den anderen kooperativen Reassoziationsprodukten fehlten.
Das Reassoziat aus a + bc (≙ 2 + 2), ein Tetramer, besitzt dagegen keine Kooperativität (n_{50} = 1,0) und eine Affinität von p_{50} = 6,8 Torr, wie die einzelnen Untereinheiten.

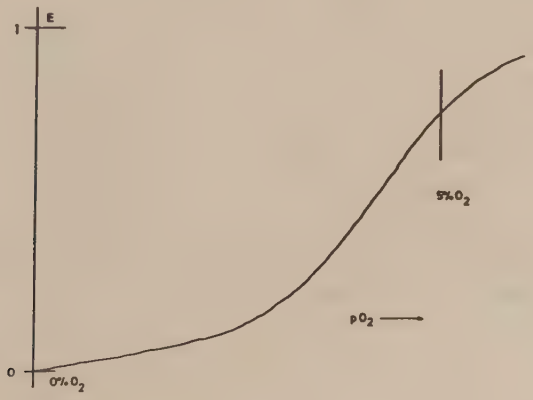
Die Suche nach besseren Reassoziationsbedingungen (im Hinblick nicht auf die strukturellen, sondern die funktionellen Eigenschaften des Reassoziats) war erst am Ende der vorliegenden Arbeit erfolgreich. Es erscheint wesentlich günstiger zu sein, 37 S-Hämocyanin mittels einer präparativen Ultrazentrifuge und nicht säulengelchromatographisch zu isolieren. Das Hämocyanin-Pellet muß in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0 in Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+} aufgenommen werden. Dissoziiert man dann, wie gewohnt, mit 0,05 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6 (in Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+}) zwei Tage lang und reassoziiert dann wieder mittels Dialyse gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, in Gegenwart von 5 mM Ca^{2+} über Nacht, so gewinnt man durch Säulengelchromatographie (in Anwesenheit von 5 mM Ca^{2+}) reassoziiertes 37 S-Hämocyanin, daß sich hinsichtlich der Affinität und Kooperativität mit undissoziiertem 37 S-Hämocyanin gut vergleichen läßt (p_{50} = 6-15 Torr , n_{50} = 6,0-6,5; Tab.22). Bemerkenswert ist, daß man in Abwesenheit von Ca^{2+} während der säulengelchromatographischen Trennung 37 S-Hämocyanin mit sehr geringer Affinität p_{50} = 30 Torr, jedoch unverändert hoher Kooperativität n_{50} = 7,84 gewinnt (Abb.67; Tab.22). Ein ähnliches Verhalten finden Treasy and Jeffrey (1980) für die Affinität bei reassoziiertem 16 S- bzw. 24 S-Hämocyanin von Cherax destructor.

Tab.22 : Funktionelle Daten von reassoziiertem 37 S-Hämocyanin
Das für die Reassoziation verwendete Ausgangsmaterial wurde ausschließlich mittels präparativer Ultrazentrifugation gewonnen. Die Abtrennung des reassoziierten 37 S-Hämocyanins erfolgte säulenchromatographisch (siehe Text), Biogel A 5m; T = 20°C. Ca^{2+} war, wie angegeben, bei der Reassoziation, Isolierung und Messung zugegen; jeweils eine Messung.

pH	Ca^{2+}	p_{50} (Torr)	n_{50} (mM)	log $p_{diss,R}$	log $p_{diss,T}$
8,0[a]	-	12,50	6,75	-0,30	2,40
8,0	5	8,71	2,56	-0,28	1,22
8,0	5	14,46	6,54	-0,40	2,16
8,0	5	5,75	3,46(6,08)[b]	-0,54	1.50
8,0	1	29,53	7,84	x	2,26
8,0	1	25,50	5,00(6,33)[b]	x	2,24

a) Referenzwerte von undissoziiertem 37 S-Hämocyanin; die Isolation erfolgte mittels präparativer Ultrazentrifugation (2 Messungen)
b) die Werte in der Klammer geben n_{max} an; in den anderen Fällen war $n_{50} = n_{max}$.
x) die Werte waren nicht ermittelbar.

Abb.67: Sauerstoffbindungskurve eines isolierten 37 S-Reassoziationsproduktes (Bedingungen siehe Tab.22)
1mM Ca^{2+}.



Zusammenfassend kann man über die Sauerstoffbindung der Reassoziationsprodukte sagen:

1) Säulengelchromatographisch isoliertes 37 S-Hämocyanin wird so verändert, daß es nach Dissoziation und Reassoziation nicht mehr die ursprüngliche hohe Kooperativität von $n_{50} \geq 6$ erreicht. Mittels präparativer Ultrazentrifugation isoliertes 37 S-Hämocyanin hat diese Eigenschaft dagegen noch.

2) Die Fähigkeit der Untereinheiten, im Reassoziat die Affinität des Molekülkomplexes auf Werte zu vermindern, wie sie den undissoziierten 37 S-Hämocyaninen entsprechen, wird durch die Art der Isolierung des Ausgangshämocyanins nicht beeinflußt.

3) Es lassen sich Hexamere gewinnen, die kooperativ sind. In jedem Fall müssen dazu das Heterodimer bc und wahrscheinlich e eingebaut sein.

4) Die Untereinheit e scheint wenigstens teilweise für die Kooperativität der Reassoziate verantwortlich zu sein.

5) Untereinheit a scheint keinen Einfluß auf das Auftreten einer Kooperativität zu haben.

6) Das Reassoziat aus d + f wird durch die Anlagerung von wenig a und e so beeinflußt, daß es eine ausgeprägte Kooperativität besitzt, ohne daß bc anwesend ist.

7) a + bc ergeben ein Tetramer, das keine Kooperativität besitzt.

16. Fixierung des 37 S-Hämocyanins im T - Konformationszustand

In den vorhergehenden Versuchen wurde gezeigt, daß in der Regel die Dissoziationskonstante für den R-Zustand von den Versuchsbedingungen unabhängig ist, die für den T-Zustand jedoch sehr stark pH (jedoch nur in Gegenwart von Magnesium- und Calciumionen) und Temperatur abhängig ist.Da infolgedessen z.B. die damit gekoppelte Oxygenierungsenergie starken Schwankungen unterworfen ist, ist es sinnvoll, genauere Kenntnisse des R- bzw. T-Zustandes und deren Wechselwirkung zu gewinnen. Ausgehend von Untersuchungen von van Driel und van Bruggen (1974), wurden die unterschiedlichen Konformationszustände - bedingt durch verschiedene Oxygenierungszustände - mit quervernetzenden Reagenzien fixiert.
Jeweils 1 ml einer 37 S-Hämocyaninlösung mit einer Proteinkonzentration vor 5 mg/ml wurde über Nacht gegen 0,1 M Triäthanolamin/HCl, pH 8,0, dialysiert. Die Proben wurden dann mit einer Wasserstrahlpumpe gut entlüftet und ca. 30 Minuten mit verschiedenen Sauerstoff + Stickstoffgemischen äquilibriert (O_2(%) + N_2(%) = 0 + 100; 5 + 95; 10 + 90; 21 + 79; 100 + 0). Anschließend wurden die Proben mit 0,1 ml einer Dimethylsuberimidat-Lösung (50 mg/ml in 1 M TEA/HCl; pH 8,0) in Gegenwart des entsprechenden Gasgemisches vereinigt. Die Reaktionszeit betrug 4 h bei 20.0°C. Danach wurden die Proben gegen 0,1 M TEA/HCl-Puffer von pH 8,0 dialysiert (dreimaliges Pufferwechseln nach jeweils 2 h), um überschüssige Reagenzien zu entfernen. Von diesen Proben wurden Sauerstoffbindungskurven angefertigt. Kleine Volumina dieser Proben wurden über Nacht gegen 0,05 M Glycin/NaOH, pH 9,6, dialysiert, nachdem sie vorher 1 : 5 verdünnt wurden. Untersuchungen in der PAGE zeigten, daß keine der Proben dissoziierte, also in jedem Fall quervernetzt war (Abb.68)

Alle Proben waren gelelektrophoretisch mit der unbehandelten Probe identisch. Die manchmal schwach sichtbare 28 S-Hämocyaninbande war schon im Ausgangsmaterial in der gleichen Intensität sichtbar. Überprüfte man alle Proben in der SDS - Plattengelelektrophorese, so trat, nicht, wie man bei einem vollständig quervernetzten 37 S Hämocyanin erwarten würde, nur eine Bande auf, sondern bis zu 15 weitere Banden mit Molekulargewichten jeder Größenordnung bis zu den Monomeren hin waren überraschenderweise zu erkennen. Das Bandenmuster war für alle Proben bzgl. des Ortes und der Intensität der Banden vollkommen gleichartig (Abb.69). Von Interesse ist das Auftreten aller Untereinheiten zu mehr als schätzungsweise 50%. Diese waren also nicht untereinander quervernetzt, obwohl man wegen der etwas geringeren Laufgeschwindigkeit, verglichen mit den unbehandelten Untereinheiten, auf ein geringfügig erhöhtes Molekulargewicht schließen und daraus folgern kann, daß die Untereinheiten intramolekular mit DSI reagiert haben. Die Ergebnisse zeigen, daß es offensichtlich ausreicht, daß das 37 S-Hämocyanin nur teilweise quervernetzt sein muß, um die 37 S-Struktur vollkommen gegen Dissoziation zu sichern.

Die Sauerstoffbindungsversuche zeigen, daß alle quervernetzten Proben ihre Fähigkeit, Sauerstoff zu binden, behalten haben. Verglichen mit unbehandelten Proben ist die Affinität der quervernetzten Proben stark erhöht worden (Tab.23,Abb.70). Die Affinität von quervernetztem 37 S-Hämocyanin zu Sauerstoff wächst zunehmend mit dem Oxygenierungszustand, in welchem die Quervernetzung durchgeführt wurde.

In jeden Fall blieb die Sauerstoffkapazität,die durch das Verhältnis der Absorptionsmaxima bei λ = 340 nm und λ = 280 nm ermittelt werden kann, für den oxygenierten und desoxygenierten Zustand unverändert.

Die Kooperativität, die im unbehandelten 37 S-Hämocyanin

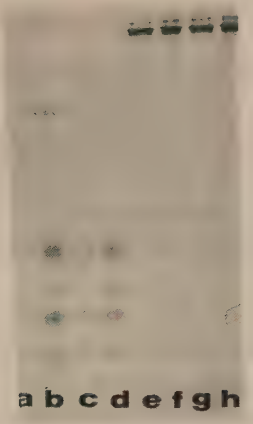


Abb.68: Plattengelelektrophorese von 37 S-Hämocyanin, das mit Dimethylsuberimidat DSI bei pH 7,5 bzw. pH 8,0 quervernetzt und anschließend 24 h gegen pH 9,6 (Glycin/NaOH-Puffer, I = 0,05) dialysiert wurde. Reaktionsbedingungen: 0,1 M TEA/HCl-Puffer, 20,0 °C, 2h, c_{Hc} = 5 mg/ml, Verhältnis Reagenz:Hämocyanin 1:1 (w/w)
a) pH 7,5; unbehandeltes 37 S-Hc; aufgetragene Menge 5 µl
b) " " " " 10 µl
c) pH 8,0 " " " 5 µl
d) " " " " 10 µl
e) pH 7,5; mit DSI quervernetztes 37 S-Hc; aufgetragenen Menge 5 µl
f) " " " 10 µl
g) pH 8,0; " " 5 µl
h) " " " 10 µl

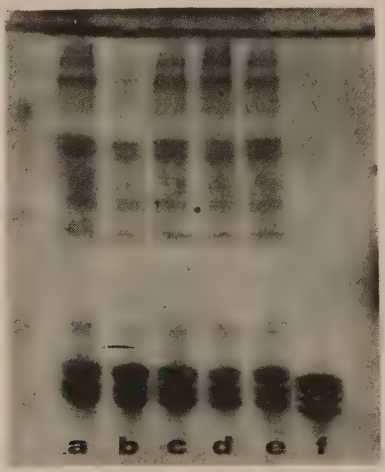


Abb.69: SDS-Plattengelelektrophorese von 37 S-Hämocyanin, das in unterschiedlichen Oxygenierungszuständen mit Dimethylsuberimidat DSI quervernetzt wurde. Reaktionsbedingungen: 0,1 TEA/HCl, pH 8,0 20,0 °C, 2 h, c_{Hc} = 5 mg/ml, Verhältnis Reagens:Hämocyanin 1:1 (w/w)
a)=100% O_2; b=21% O_2; c=10% O_2; d=5% O_2; e=0% O_2; f=unbehandelte Probe. Der prozentualle Rest war jeweils N_2.
Eine Molekulargewichtsbestimmung wurde nicht durchgeführt.

wahrscheinlich durch die Wahl des Puffers bedingt - mit n_H = 2,4 - 2,8 schon sehr niedrig war, wurde durch Quervernetzung des Moleküls noch weiter vermindert (n_H = 1,63 - 2,07). Es ist offensichtlich aber nicht möglich, das Molekül so vollständig zu fixieren, daß n_H= 1, also die Unterdrückung der kooperativen Wechselwirkung, erreicht wird.

Auffallend ist das Verhalten des im desoxygenierten Zustand (= T-Konformationszustand) quervernetzten 37 S-Hämocyanins. Alle anderen Kurven gehen mit zunehmender Sauerstoffbeladung von nahezu einem T in einen R - Zustand, welche durch die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten $p_{diss,T}$ = 12,3 - 17,8 Torr und $p_{diss,R}$ = 1,05 Torr charakterisiert werden können.

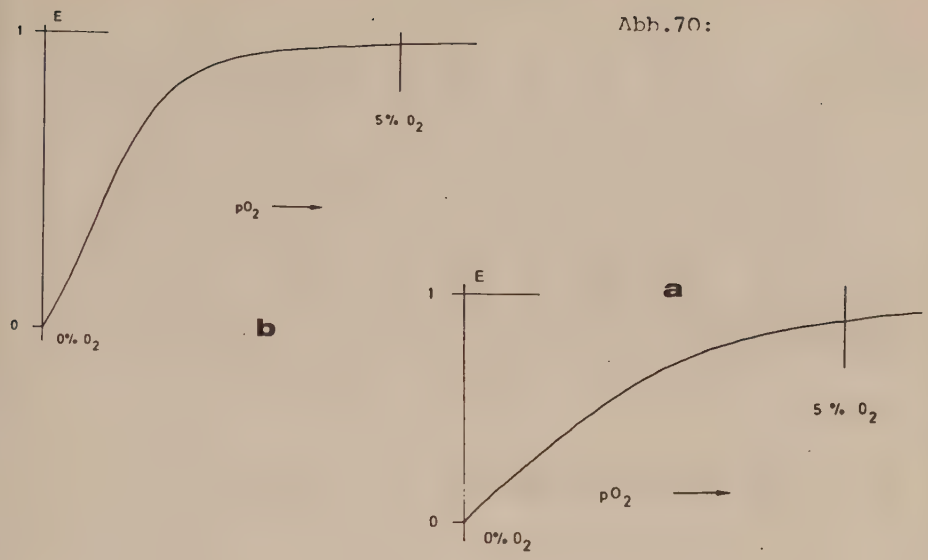
Eine Ausnahme stellt das in 100% N_2 quervernetzte 37 S-Hämocyanins dar. Hier ist $p_{diss,R}$ = 6,05 Torr sechsmal so hoch wie die Konstante der übrigen Proben und nähert sich damit der Dissoziationskonstanten für den T-Zutand (3 Versuche).

Durch die Quervernetzung im desoxygenierten Zustand, scheint die Konformation des 37 S-Moleküls (oder der überwiegenden Anzahl der Moleküle) im T-Zustand fixiert zu werden. Eine Konformationsveränderung beim Übergang vom T- in den R-Zustand (wie sie nach dem MWC Modell gefordert wird) wird erschwert oder gar verhindert.

Abb.70: Originalaufzeichnung von Sauerstoffbindungskurven von 37 S-Hämocyanin, das in unterschiedlichen Oxygenierungszuständen mit Hilfe von DSI quervernetzt wurde. Bedingungen wie in Abb.
Die Quervernetzung erfolgte bei a) im desoxygenierten Zustand und bei b) in Gegenwart von 21% O_2 + 79% N_2.

Abb.71: Hill-Diagramm für die Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins, das in unterschiedlichen Oxygenierungszuständen mit Hilfe der quervernetzenden Reagenz Dimethylsuberimidat DSI fixiert wurde. Reaktionsbedingungen: 0,1 M Triäthanolamin/HCl, pH 8,0, 20°C, Verhältnis Reagenz:Hämocyanin = 1:5 (w/w);
▽ = unbehandelte Probe; ▼= 0% O_2; ○ = 5% O_2;
■ = 10% O_2; △ = 21% O_2; ● ≙ 100% O_2.
Meßbedingung: Puffer wie oben, c_{Hc} = 0,15 mg/ml.

Abb.70:


E
1
0
5% O_2
pO_2
0% O_2
b
E
1
a
5 % O_2
0
pO_2
0% O_2

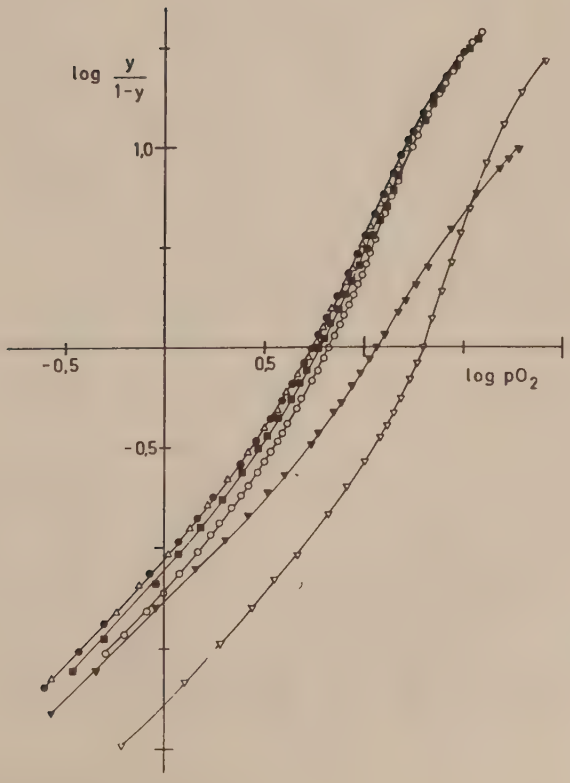

log $\frac{y}{1-y}$
1,0
-0,5
0,5
log pO_2
-0,5

Abb.71:

Tab. 23: Funktionelle Daten des 37 S-Hämocyanins, das in verschiedenen Oxygenierungsstufen mit Dimethylsuberimidat (DSI) quervernetzt wurde.
Meßbedingungen: 0,1 M TEA/HCl-Puffer, pH 8,0; T = 20,0°C; c_{Hc} = 0,15 mg/ml.

biochemisch fixierte Oxygenierungssufe (%) O_2	N_2	p_{50} (Torr)	n_{50}	$p_{diss,R}$ ($Torr^{-1}$)	$p_{diss,T}$ ($Torr^{-1}$)	c
0	100	11,48± 1,20 n = 3	1,55± 0,20	6,03	17,78	0,339
5	95	7,41 n = 2	2,07	1,05	16,60	0,063
10	90	5,96 n = 1	1,90	1,05	14,13	0,074
21	79	5,50± 0,50 n = 3	1,84± 0,25	1,05	12,30	0,084
100	0	5,50= n = 1	1,78	1,05	12,30	0,085
37 S-Hc Referenz		19.05 n = 2	2.87	2,95	58,88	0,050

D. DISKUSSION

Das in vivo vorkommende Oligomer ist im Falle des Vogelspinnenhämocyanins homogen (Markl et al., 1980). Es wird jedoch von 7 proteinchemisch und immunologisch unterschiedlichen Polypeptidketten aufgebaut (Schneider et al., 1977; Lamy et al., 1979; Strych, 1981). Die Bedeutung dieser Heterogenität könnte in unterschiedlichem funktionellen Verhalten der Polypeptidketten oder / und in spezifischen Aufgaben für die Architektur des Oligomers liegen.

1. Zur funktionellen Rolle der Untereinheiten

Die funktionelle Charakterisierung der einzelnen Untereinheiten brachte aber kaum signifikante Unterschiede zu Tage. Ihre Sauerstoffaffinitäten lagen um 5 Torr, ein Bohreffekt konnte nicht festgestellt werden und die Kooperativität beträgt, wie zu erwarten war, nur 1 (Decker et al., 1979; Tab.24). Lamy et al. (im Druck, 1981) fanden später bei den Untereinheiten von Androctonus australis - Hämocyanin: Die Affinitäten lagen für pH 7,5 und 8,9 auch bei 5 Torr und die Kooperativität betrug in jedem Fall $1 \pm 0{,}1$. Eine Ausnahme scheint es sowohl beim Androctonus wie beim Eurypelma-Hämocyanin zu geben: Jeweils eine Untereinheit tritt, verglichen mit den anderen, durch eine etwas höhere Affinität hervor, Untereinheit d bei Eurypelma und Untereinheit 2 bei Androctonus. Diese nehmen im 37 S-Partikel analoge Positionen ein (Lamy et al., 1981b; Markl et al., in Vorbereitung). Ähnliche Untersuchungen sind nur noch von Limulus polyphemus bekannt. Es wurden jedoch nur 5 chromatographische Fraktionen untersucht (Sullivan et al., 1976), denen aber nach Markl et al. (1979a) 8 - 12 verschiedene Untereinheiten zuzuordnen sind. Die Affinitäten sind mit p_{50} = 1,5 Torr sehr viel höher, sieht man von Zone V (p_{50} = 5,5 Torr) ab. Allerdings ist auch hier kein Bohreffekt feststellbar (Tab.24). Ähnliche hohe Affinitäten

wurden bei den Untereinheiten von Cupiennius salei gefunden. Zum funktionellen Verhalten der Untereinheiten steht das des nativen 37 S-Hämocyanins in krassem Widerspruch (Abb.72). Denn hier konnte ein ausgeprägter Bohr-Effekt gefunden werden. Dabei besitzt das Molekül bei pH = 7,0 eine ausgesprochen niedrige Affinität; mit zunehmendem pH steigt diese aber sogar über die Affinität der isolierten Untereinheiten hinaus. Außerdem besitzt das 37 S-Hämocyanin eine ausgeprägte Kooperativität ($n > 1$, Loewe 1978). Beide Effekte sind offensichtlich neu gewonnene Eigenschaften einer komplizierten Quartärstruktur; sie sind ein Produkt der Wechselwirkung der Untereinheiten untereinander. Entsprechendes gilt auch für das Hämocyanin aus Limulus (Sullivan et al., 1976)

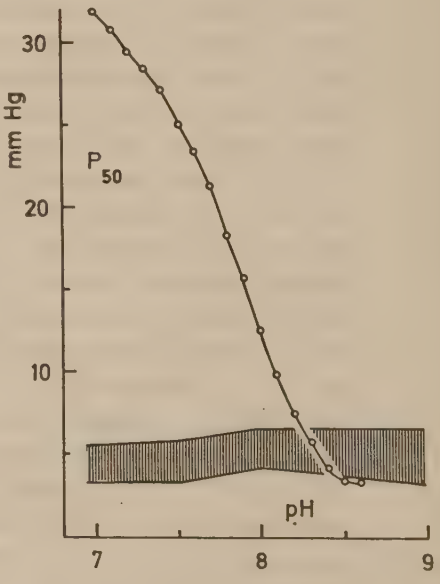


Abb.72: Sauerstoffaffinität (ausgedrückt als p_{50} in mm Hg) in Abhängigkeit vom pH für das 37 S-Hämocyanin (durchgezogene Linie) und die isolierten Untereinheiten (schraffierte Fläche). Die Werte für das 37 S-Hc wurden der Arbeit von Loewe (1978) entnommen (bei 25 °C; Tris/HCl Puffer, I = 0,1); die Werte für die isolierten Untereinheiten wurden bei 20 °C gemessen, Tris/HCl, I = 0,1 oder Glycin/NaOH Puffer pH 9,6, I = 0,05.

Tab. 24 : Halbsättigungsdruck p_{50} (in Torr) von Untereinheiten der Hämocyanine verschiedener Tierspezies

Tierart	pH	Untereinheiten bzw. Fraktionsnummern								Referenzen
Limulus		I	II	III	IV	V				Sullivan et al.,
polyphemus	7,5	2,1	1,4	1,4	1,0	5,9				1976
T = 20°C	9,0	2,2	1,6	1,5	1,0	5,7				
Androctonus		1	2	3A	3B	4	5A	6	stripped	Lamy et al., im Druck
australis	7,5	7,26	2,32	5,55	5,94	6,16	3,33	3,93	4,79	1981
T = 20°C	8,9	6,27	2,79	5,42	6,61	4,68	3,44	3,56	4,17	
Eurypelma		a	d	e	f	g	bc			diese Arbeit,
californicum	7,5	5,01	3,68	4,69	5,17	6,13	4,47			Decker et al.,
T = 20°C	9,6	5,30	3,03	3,56	4,31	5,89	5,95			1979
Cupiennius	9,6	1+2		2+3	3+4	5	Dimer	Monomerengemisch	alle gemischt	diese Arbeit
salei										Markl et al.,1981
T = 20°C		3,6		3,6	3,5	3,5	2,7	3,5	3,4	

und das aus Androctonus (Lamy et al., im Druck, 1981). Obwohl die heterogenen Untereinheiten keine dieser Eigenschaften besitzen, die Heterogenität bezüglich der isolierten Untereinheiten also keinen sichtbaren Sinn ergibt, ist es jedoch vorstellbar, daß die Untereinheiten innerhalb des nativen Oligomers eine fuktionelle Heterogenität entwickeln. Im Augenblick kann darüber jedoch noch nichts ausgesagt oder auch nur spekuliert werden.

2. Zur strukturellen Bedeutung der Untereinheiten

Eine Untersuchung über die Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten kann erst dann erfolgversprechend angegangen werden, wenn ausreichende Informationen über die Quartärstruktur und über die Kontaktmöglichkeiten zwischen den Untereinheiten vorliegen. Zwei Wege zur Lösung dieses Problems wurden beschritten, einmal durch Reassoziationsexperimente und einmal durch Aufbrechen des Oligomers mittels Dissoziation oder peripherer Spaltung (limitierter Proteolyse).

2.1. Die Abhängigkeit der Reassoziation von verschiedenen Parametern

Die Fähigkeit zur Reassoziation von Hämocyaninuntereinheiten wurde vor fast eineinhalb Jahrzehnten erkannt (Van Bruggen and Fernandez - Moran, 1966) und seitdem immer wieder bestätigt. Parameter wie die Temperatur, Proteinkonzentration, Puffermilieu, zweiwertige Ionen und Ionenstärke spielten dabei oft eine bedeutende Rolle. Meine Versuche wurden in Tris/HCl-Puffer durchgeführt, da man in ihm, verglichen mit anderen Puffern eine 100prozentige Ausbeute an 37 S-Hämocyanin gewann (Schmid, 1976). Die Temperatur (5°und 20°C) hatte auf die Reassoziation qualitativ und quantitativ keinen signifikanten Einfluß. Für die Rekonstitution von Ribosomen

ist z.B. ein zweimaliger Temperaturwechsel notwendig (Sengbusch 1980, Seite 336). Die Ausbeute an 37 S-Hämocyanin ist nur bei sehr niedrigen Konzentrationen von der Proteinkonzentration abhängig. Bei niedrigeren Konzentrationen sind auch Intermediate in der Größenordnung von Hexameren und Dodekameren zu beobachten. Das Assoziations - Dissoziationsgleichgewicht gehorcht hier erkennbar dem Massenwirkungsgesetz. Oberhalb von 1,5 mg/ml ist dagegen die Ausbeute an 37 S-Hämocyanin auch bei weiter steigender Proteinkonzentration stets gleich groß (ca. 70-75%) . Außerdem sind keine Zwischenstufen mehr zu entdecken. Dies spricht für einen kooperativen Assoziationsprozeß, wie er auch für Hämerythrin (Langerman and Klotz, 1969) gefunden wurde und für Oligomere allgemein angenommen wird. (Lehninger, 1977, S 821).

a) Einfluß von Ca und Mg

Die Rolle von Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen auf die Quartärstruktur von Arthropodenhämocyaninen ist bis heute noch nicht ganz klar. Eine generelle Beobachtung ist, daß beide in einem weiten pH-Bereich die Dissoziation verhindern (Loewe and Linzen, 1972). Ihre Rolle bei der Reassoziation hängt vom Hämocyanintyp ab. Prinzipiell greifen sie dabei auf verschiedenen Ebenen ein: bei der Bildung von Hexameren aus Monomeren, sowie bei den Schritten, die zu höheren Aggregaten führen (25 S, 37 S und 60 S). Im Falle des Eurypelmahämocyanins werden Mg^{2+} und Ca^{2+} für die Verknüpfung der Untereinheiten offensichtlich nicht benötigt, da das 37 S-Hämocyanin sich auch in deren Abwesenheit bildet und natives 37 S-Hämocyanin selbst nach intensiver Dialyse gegen EDTA nicht dissoziiert (Schmid, 1976). Allerdings machen sich die Ionen bei der Reassoziation durch unterschiedliche Effekte bemerkbar. In Gegenwart von Mg^{2+} wird 37 S-Hämocyanin gebildet; keine hexamere Komponente konnte dabei beobachtet werden, und ca. 40% des Proteins blieben

als Monomere zurück. Im Gegensatz dazu treten in Gegenwart von Ca^{2+} eindeutig Hexamere auf. Zieht man das Reassoziationsverhalten des Hämocyanins in Abwesenheit der Ionen zum Vergleich heran, so scheinen Mg^{2+} und Ca^{2+} einen gewissen, aber unterschiedlichen, negativen Einfluß auf die Ausbeute an 37 S-Hämocyanin auszuüben; bei hohen Konzentrationen wird dieser negative Effekt sehr deutlich. Es scheint also, daß die Rolle von Ca^{2+} und Mg^{2+} auf die Quartärstruktur des Hämocyanins aus Eurypelma beschränkt ist.

Ein sehr ähnliches Verhalten zeigen die Untereinheiten von Limulus-Hämocyanin. Sie reassoziieren in Gegenwart von EDTA zu (4x6)-Strukturen. Die für Limulus-Hämocyanin typische (8x6)-Struktur wird jedoch nur bei Zugabe von Ca^{2+} gebildet (Schutter et al., 1977). Bijlholt et al. (1979) bemerkten zudem, daß nach Dialyse gegen EDTA-Puffer weniger (8x6)-Moleküle auftraten. Dagegen stabilisiert anscheinend Ca^{2+}-Puffer die Reassoziate. Im Elektronenmikroskop erscheinen sie kompakter und mit ausgeprägten Konturen. Auf der anderen Seite führt die Zugabe von 10 mM Mg^{2+} zum dissoziierten Hämocyanin von Cancer magister bei pH 10 zu Hexameren (Ellerton et al., 1970). Jedoch ist hier noch zu klären, ob diese Hexamere mit dem nativen Hämocyanin identisch sind. Bei ähnlichen Experimenten, die am Hämocyanin von Cherax destructor durchgeführt wurden, beobachteten Jeffrey et al. (1978) mehrere 17 S-Komponenten.

Bei den Hämocyaninen aus Crustaceen ist die Abhängigkeit der höheren Aggregationsstufen von Mg^{2+} und Ca^{2+} gut untersucht. Callianassa-Hämocyanin liegt in Abwesenheit von Mg^{2+} vollständig in der 16 S-Form vor, in Gegenwart von 50 mM Mg^{2+} jedoch in der 39 S- (4x6) Form; zwischen beiden Zuständen herrscht ein Gleichgewicht (Roxby et al., 1974). Ca^{2+} scheint in der gleichen Weise zu wirken wie Mg^{2+}. Beim Hämocyanin von Homarus americanus begünstigt Ca^{2+} die Bildung von Dodekameren aus Hexameren; pro Dodekamer werden 5 Kalziumionen gebunden (Morimoto and Kegeles, 1971).

Die Bindung zwischen zwei Hexameren kann jedoch auch auf andere Weise als mit Hilfe zweiwertiger Ionen erfolgen. In den Fällen von Cherax destuctor (Murray and Jeffrey, 1978), Astacus leptodactylus (Markl et al., 1979; Pilz et al., 1980), und der Spinne Cupiennius salei (Markl, 1980; Markl et al., 1979) wird die dodekamere Struktur durch ein, zwischen den beiden Hexameren vermittelndes, Dimer stabilisiert. Ähnliches dürfte auch für Dimere gelten, die durch sehr starke, nicht kovalente Kräfte zusammengehalten werden. Ein Beispiel hierfür ist das Heterodimer bc von Eurypelma californicum.

b) Einfluß der Ionenstärke

Wachsende Ionenstärke stabilisiert das Eurypelma-Hämocyanin gegenüber dissoziierenden Bedingungen (Schmid, 1976) und begünstigt bis zu einer bestimmten Grenze die Reassoziation. Durch die Erhöhung der Ionenstärke verstärkt sich die Wechselwirkung zwischen den hydrophilen Aminosäureresten und den Ionen des Mediums in der Weise, daß die Wechselwirkung zwischen hydrophoben Resten stark zunimmt. Da bei einer Ionenstärke von 1,0 jedoch die höchste Aggregationsstufe das Hexamer ist, müssen mindestens zwei verschiedene Gruppen von hydrophoben Wechselwirkungen auftreten:
1) zum einen, diejenige zwischen den einzelnen Untereinheiten; sie bedingen den Zusammenhalt des Hexamers
2) Zum anderen, diejenigen zwischen den Hexameren. Die Bindung zwischen diesen scheint schwächer zu sein, da bei I = 1,0 keine Dodekamere oder größere Strukturen, jedoch ca. 50 % Hexamere auftreten. Das Hexamer scheint ein energetisch besonders günstiges Aggregat zu sein. Wahrscheinlich stellen die bei hoher Ionenstärke gebildeten Hexamere Fehlassoziate dar. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Lamy et al. (1977) bei der Untersuchung der Auswirkung steigender Salzkonzentration auf die harnstoffabhängige Dissoziation von Androctonus Hämocyanin. Sie beobachteten, daß

der stabilisierendere Effekt mit wachsender Konzentration durch ein Maximum geht. Bei 0,1 M NaCl findet eine Dissoziation des Hämocyanins durch 1 M Harnstoff nicht mehr statt.

2.2. Die Bedeutung des reassoziierten Hexamers

Eine Möglichkeit, die Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten strukturell und funktionell zu analysieren, besteht darin, Intermediate bei der Assoziation quantitativ aufzufangen und zu untersuchen. In dieser Hinsicht schien das Auftreten eines Hexamers bei Reassoziationsexperimenten von besonderem Interesse. Nach 24-stündiger Reassoziation in Gegenwart von 4 mM Ca^{2+} konnte Schmid (1976) in der analytischen Ultrazentrifuge ca. 60 % 16 S-Hämocyanin (Hexamere) nachweisen. Während mit fortschreitender Reassoziationszeit der 16 S-Anteil sich verringerte, erhöhte sich der Anteil an 37 S-Hämocyanin von ca. 15 % (nach 24 h) auf 60 % (nach 182 h). Eine Steigerung der Proteinkonzentration von 0,25 mg/ml auf das vierfache (1 mg/ml) erbrachte bereits nach 12 h eine Ausbeute von ca. 70% 37 S-Hämocyanin, die sich mit fortschreitender Zeit langsam erhöhte, während der 16 S-Anteil von anfänglich 30% (nach 12 h) auf ca. 20% (nach 66 h) absank (Abb.10). Diese Ergebnisse konnten folgendermaßen interpretiert werden: Als Zwischenstufe tetramerisiert das Hexamer unter Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetztes zum 37 S-Hämocyanin. Dabei scheint die Assoziation zum Hexamer jedoch rascher abzulaufen als dessen Tetramerisierung . Die Untersuchung des isolierten Hexamers ergab jedoch, daß es nicht zu dimerisieren oder zu tetramerisieren vermag.
Bei der Analyse der enthaltenden Untereinheiten stellte sich heraus, daß das Heterodimer bc nicht eingebaut war. Das Hexamer (dessen Einheitlichkeit allerdings nicht untersucht wurde) stellt somit ein "dead end" - Produkt eines

Seitenweges bei der Reassoziation dar.
Ähnliche Produkte gewinnt man beim Androctonus-Hämocyanin (Lamy et al., 1981). Hier fehlt die Untereinheit Andr. 1. Die Frage, ob bei der langsamen Weiterreaktion zum 37 S-Hämocyanin das Hexamer zuerst wieder zerfallen muß, oder ob die falschen Untereinheiten nacheinander gegen die richtigen ausgetauscht werden, kann nicht beantwortet werden. Zwar reassoziiert nach Dissoziation des Hexamers das Gemisch der Untereinheiten in Gegenwart von bc überwiegend zu 37 S-Hämocyanin, während ohne vorherige alkalische Dissoziation aus dem Hexamer bei Zugabe von bc das 37 S-Hämocyanin nur langsam entsteht; jedoch könnte, bedingt durch eine möglicherweise langsame Abdissoziation der einen Untereinheit d, die anstelle von bc im metastabilen Hexamer eingebaut ist, die Austauschgeschwindigkeit herabgesetzt sein. Das Fehlen von Intermediaten, die nicht Hexamere oder Vielfache davon darstellen, läßt vermuten, daß solche Intermediate besonders instabil sind. Stabilität wird offensichtlich erreicht, wenn jede Untereinheit Kontakt mit vier anderen hat, die Kontaktstellen also abgesättigt sind (s.u.). Fehlassoziate wurden auch von Bijlholt et al. (1979) bei Limulus-Hämocyanin beobachtet, wenn bestimmte Fraktionen bei der Reassoziation weggelassen wurden. Die nachfolgende Zugabe dieser Fraktionen führte dann auch hier zu höheren Assoziationsstufen. Bijlholt et al. (1979) schlugen die Möglichkeit eines Austausches der " falschen " gegen die " richtige " Untereinheit vor.
Die Reassoziation bei Hämocyanin verläuft wohl in der Weise gerichtet, daß eine Untereinheit nach der anderen in der richtigen Reihenfolge zu dem wachsenden Komplex assoziiert. Das Auftreten von Fehlassoziaten kann leicht erklärt werden. Ohne weiteres kann man annehmen, daß alle Untereinheiten durch einen einheitlichen Typ repräsentiert werden: globulär, ca. 70.000 Dalton, eine Sauerstoffbindungsstelle. Die Möglichkeit zu Fehlassoziationen wird dadurch erleichtert. Dies würde auch die sehr geringe Abhängigkeit

der Ausbeute an " gelungenem " reassoziiertem 37 S-Hämocyanin von der Proteinkonzentration erklären. Der Effekt des Massenwirkungsgesetzes wird nur unterhalb einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml und nach kurzer Reassoziationszeit (12 h) beobachtet, während bei höheren Konzentrationen und längerer Reassoziationszeit die Ausbeute an 37 S-Hämocyanin praktisch konstant bleibt. Die Anzahl an " misfit-collisions " muß aber mit anwachsender Proteinkonzentration und der Anzahl an verschiedenen Untereinheiten exponentiell wachsen, wobei dann die erwartete Zunahme an " korrektem " 37 S-Hämocyanin unterdrückt wird.

2.3. Die Notwendigkeit von heterogenen Untereinheiten

Zur Klärung der letzten Frage sind Versuche naheliegend, bei denen man ein Untereinheitengemisch reassoziiert, wobei jeweils eine Untereinheit fehlt. Die entsprechenden Versuche zeigten, daß nur in Gegenwart aller Untereinheiten wieder stabiles 37-Hämocyanin aufgebaut wird. Zur Reassoziation des 60 S-Hämocyanins von Limulus polyphemus ist dagegen die Zone I (von insgesamt 5 chromatographische Fraktionen) nicht nötig. Warum werden aber so viele verschiedene Untereinheiten benötigt?
Überlegungen zu der erforderlichen Mindestanzahl von verschiedenen Untereinheiten im Hämocyanin-Oligomer stellen Klarman et al. (1979) unter der Annahme äquivalenter Positionen für die einzelnen Untereinheiten im 16 S-, 24 S-, 36 S- und 60 S-Hämocyaninen an. Dabei ergaben sich für ein 16 S-Hämocanin ein, für ein 24 S-Hämocyanin drei, für ein 36 S-Hämocyanin vier und für ein 60 S-Hämocyanin fünf verschiedene Typen von Untereinheiten. Klarman et al. gingen dabei von einem Kugelmodell aus. Im Hexamer ordnen sich 6 Untereinheiten nach verschiedenen Autoren in den Ecken einer regulären Octahedrons (Wibo, 1966; Jeffrey, 1979; Klarman et al., 1979; Jeffrey and Andrews, 1980; Pils et al.,

1980) bzw. trigonal antiprismatrisch an (Scheman, 1975 ; Schutter et al., 1977 ; van Schaick et al., 1981). Dabei wird durch die 12 Kontakte zwischen den Untereinheiten das Hexamer in der stabilsten Assoziationsform dargestellt (Klotz et al. 1975). Zur Bildung dieser Struktur ist nur ein Typ von Untereinheiten notwendig, der 4 Bindungsstellen besitzt. Rotiert man zwei Hexamere gegeneinander um 90° in der Weise, daß zwischen beiden ein enger Kontakt über vier Verknüpfungspunkte zustande kommt, so werden 6 Untereinheiten benötigt. Man gewinnt somit ein Dodekamer, dessen Projektion ein hexagonales und ein quadratisches Profil zeigt, wobei sie eine gemeinsame Fläche haben (Schutter et al., 1977). In diesem Fall sind drei verschiedene Untereinheiten notwendig, die 4,5 bzw. 6 unterschiedliche Bindungsstellen besitzen. Sind zwei Hexamere nur durch 3 oder weniger Kontakte miteinander verknüpft, so kommt man schon mit 2 Typen von Untereinheiten aus.

Durch parallele bzw. antiparallele Assoziation zweier Dodekamere gewinnt man ein 24-mer; in dem nativen Hämocyanin stoßen die Dodekamere nur mit einer Kante aufeinander. Im Elektronenmikroskop ist eine tiefe Spalte zwischen ihnen erkennbar (vergleiche die Seitenansicht des 37 S-Hämocyanins in Abb.11). Zwei " Stege " überbrücken den Spalt. Ein Steg wird vermutlich durch zwei Untereinheiten gebildet, wobei jedes Dodekamer dazu eine beisteuert. Dies erfordert einen zusätzlichen Untereinheitentyp, sodaß für die Bildung eines 24-mers mindestens 4 Typen von Untereinheiten notwendig sind. Berücksichtigt man, daß van Schaick et al. (1981) bei der Röntgenstrukturanalyse am 16 S-Hämocyanin von Panulirus interruptus für die Untereinheiten eine nierenförmige Struktur erkannten, ein Modell aus Kugeln also nicht korrekt wäre, so bleibt die Anzahl an notwendigen Untereinheiten bezüglich ihrer unterschiedlichen Kontaktstellen dennoch gleich. Ein Vorteil des " Nierenmodells " ist jedoch

Tab.25: Heterogenität von Polypeptidketten in Arthropoden-hämocyaninen

Aggregationshöhe	Mindestanzahl an äquivalenten Positionen	gefundene Anzahl unterschiedlicher Polypeptidketten	Spezies	Referenz
16 S	1	1	Cupiennius salei	Markl,1980
		1	Cancer pagurus	Rochu and Fine,1980
		1	Cherax destructor	Murray and Jeffrey,197
		2	Astacus leptodactylus	Markl and Kempter,1980
		2	Panulirus vulgaris	"
		3	Palinurus interruptus	Kuiper et al.,1975
		3	"	van der Berg et al,197
		3	Jasus edwardsii	Robinson and Ellerton, 197
24 S	2	2	Cancer magister	Loehr and Mason, 1973
		2	"	Carpenter and van Holde 1973
		3	Cancer pagurus	Markl and Kempter,1980
		3	Cancer pagurus	Rochu and Fine,1980
		2	Cupiennius salei	Markl,1980
		2	Callinectes sapidus	Hamlin and Fish,1977
		3	Astacus leptodactylus	Markl and Kempter,1981
		3	Homarus americanus	"
		3	Cherax destructor	Murray and Jeffrey,1978
37 S	4	5	Heterometrus sp.	Sugita and Sekiguchi,19
		5	Leirus quinquestriatus	Klarman et al.,1979
		6-7	Trichodoman froesi	Markl et al.,1979
		7	Tarantula palmata	"
		7	Eurypelma californicum	"
				Strych,1981
		8	Androctonus australis	Lamy et al.,1979
				Markl et al.,1979
60 S	> 4	8-12*	Limulus polyphemus	Sullivan et al.,1976
				Markl et al.,1979

* mit elektrophoretischen Methoden lassen sich 12, mit immunologischen jedoch nur 8 verschiedene Untereinheiten unter-

darin zu sehen, daß man damit regelmäßigere Strukturformen gewinnt, die im Schattenriß den elektronenmikroskopischen Strukturen wesentlich mehr ähneln, als entsprechende eines Kugelmodells. So stehen z.B. die Symmetrieachsen zweier Hexamere, die zu einem Dodekamer assoziieren, aufeinander senkrecht.
Ein Blick in die Literatur (Tab.25) zeigt, daß z.B. das 16 S-Hämocyanin (Hexamer) von Cupiennius salei tatsächlich von einem einzigen Untereinheitentyp aufgebaut wird (Markl, 1980), während in anderen Hexameren 2-3 unterschiedliche Typen in nativen Hämocyaninen gefunden wurden (Tab.25). Bei nativen Dodekameren hingegen wurden mindestens 2 bzw. 3 unterschiedliche Untereinheiten nachgewiesen. Zwei Hexamere können z.B. über eine Kontaktstelle miteinander verbunden sein, wie dies bei Cupiennius salei der Fall ist (Wibo, 1966; Markl, 1980) Sie wird beim 24 S-Hämocyanin aus Cupiennius durch ein Homodimer ausgebildet, wobei jedes Hexamer eine Untereinheit enthält.
Um diese sind Untereinheiten eines anderen Typs assoziiert. Beim 24-mer wird die geforderte Mindestanzahl von 4 unterschiedlichen Polypeptidketten nicht unterschritten (Tab.25). Interessant ist ein Vergleich mit den Reassoziationsversuchen. Zur Assoziation eines Hexamers benötigt man beim Eurypelma-Hämocyanin mindestens 3, eines Dodekamers 5, und eines 24-mers mindestens 6 verschiedene Untereinheiten. Da aber aus den geometrischen Überlegungen zum Aufbau der Strukturen nicht so viele Untereinheitentypen notwendig sind, läßt dies die Vermutung zu, daß der Grund für die darüber hinausgehende Heterogenität in der funktionellen Bedeutung der verschiedenen Untereinheiten zu suchen ist.

2.4. Vorschlag eines Modells des 37 S-Hämocyanins von Eurypelma californicum

Auf Grund der Reassoziationsversuche lassen sich für die einzelnen Untereinheiten folgende strukturellen Aufgaben

annehmen:

Untereinheit	mögliche strukturelle Rolle bei der Reassoziation
a	Hexamer ⟶ Dodekamer
bc	Hexamer ⟶ Dodekamer
	Dodekamer ⟶ 24-mer
f	Dodekamer ⟶ 24-mer
g	Dodekamer ⟶ 24-mer
e	Stabilisierung des 24-mers
d	keine spezielle Aufgabe, jedoch notwendig für ein 24-mer (Hexamer ⟶ 24-mer)

Eine zentrale strukturelle Bedeutung im 37-S-Hämocyanin von Eurypelma californicum fällt dem Heterodimer bc zu. Van Bruggen et al. (1980) konnten durch Hybridisierung von Untereinheiten der Hämocyanine von Limulus polyphemus, Androctonus australis und Eurypelma californicum zeigen, daß die Dimeren Lim V, Andr 1 und Eury bc gleichwertig austauschbar die Rolle der Verknüpfung zweier Dodekamere zu einem 24-mer übernehmen. Auf Grund von immunologisch-elektronenmikroskopischen Ergebnissen von Lamy et al. (1981) stellt das Dimer Andr 1 die Brücke zwischen zwei Dodekameren dar. Aus den Reassoziationsergebnissen muß man weiterhin folgern, daß bc und a für die Verknüpfung zweier Hexamere zum Dodekamer verantwortlich sind (in Abwesenheit von bc oder a gewinnt man keine höheren Aggregate als (1x6). Unter der Annahme einer Ringbildung von 2 Heterodimeren bc analog zu den Befunden von Lamy et al. (1981) läßt sich ein hypothetisches Modell des 37 S-Hämocyanins konstruieren (Abb.73) :

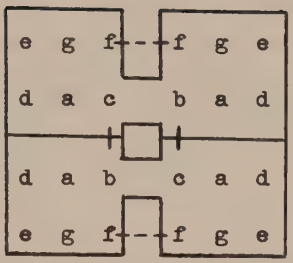
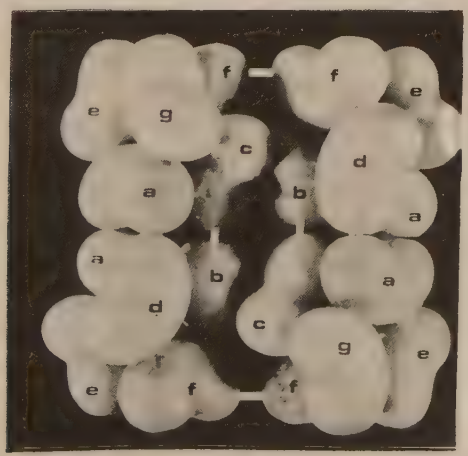


Abb.73 : Hypothetisches Modell des 37 S-Hämocyanins auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. (Zwei Hexamere werden über abca, zwei Dodekamere über bccb und wahrscheinlich 2 x ff zusammengehalten.

Abb.74 : (persönliche Mitteilung Markl, 1981): Hypothetisches Modell des 37 S-Hämocyanins auf Grund von immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen. Die nierenartige Form der Untereinheiten (nach van Schaick et al., 1981) wurde zugrunde gelegt. Die Balken geben die eventuell wichtigen Verbindungen wieder: bc verbindet zwei Hexamere, ff spielt bei der Verknüpfung zweier Dodekamere eine gewichtige, jedoch nicht klar ersichtliche Rolle.



In jedem Hexamer ist eine Polypeptidkette des Heterodimers bc vertreten. Mindestens einer der Kontakte zwischen zwei Hexameren sollte durch die Untereinheit a hergestellt werden. f sollte die Ringbildung von 2 x bc positiv beeinflussen (da in Abwesenheit von f, aber in Anwesenheit von bc keine höheren Aggregate als Dodekamere gefunden wurden) oder / und eine zusätzliche Verbindung zwischen den zwei Dodekameren aufbauen. Letzteres scheint nach neuesten Untersuchungen der Fall zu sein (Markl, persönliche Mitteilung). Die Positionen der anderen Untereinheiten bleiben unklar. §

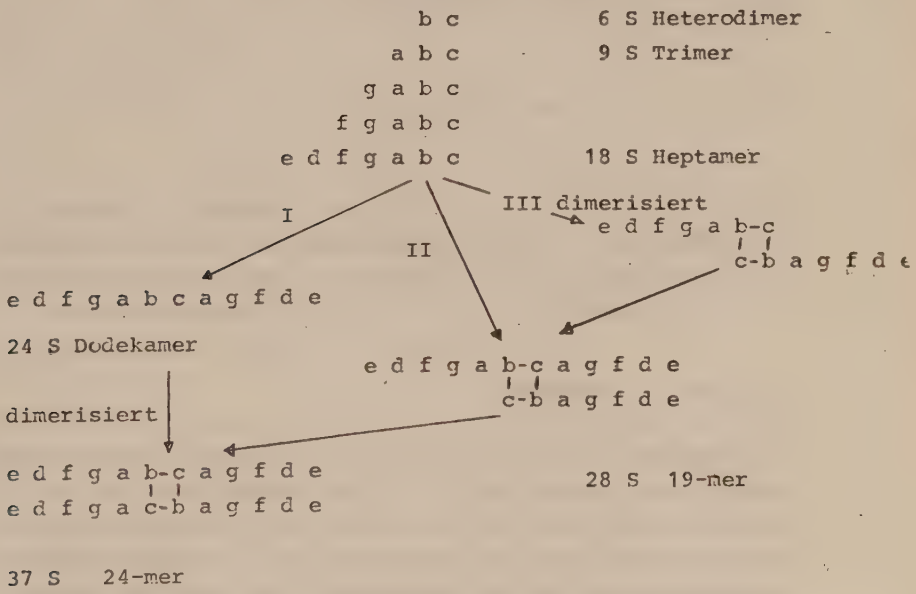
2.5. Heterologe - isologe Assoziation

Nach Monod et al. (1965) kan man zwei Arten von Assoziationen von Untereinheiten in einem Oligomer unterscheiden: heterologe und isologe Assoziation. Beide Arten sind bei Hämocyaninen verwirklicht: Jeweils drei Untereinheiten assoziieren heterolog zu einem Trimer, zwei Trimere dimerisieren isolog zum Hexamer. Durch den Einbau von speziellen Untereinheiten ist die isologe Assoziation zweier Hexamere zu einem Dodekamer möglich. Die zwei Dodekamere dimerisieren punktsymmetrisch isolog zum 24-mer.
Pauling schreibt, " proteins are inherently 'sticky', and the structures of enzymes must have been selected against the tendency to form random aggregates " (Zitat bei Monod et al., 1965). Da nach Monod et al. (1965) eine isologe Assoziation eine Struktur nach außen hin abschließt, kann man die Hämocyanine als eine sehr gute Stütze für diese Überlegungen ansehen: Alle durch isologe Assoziation auf der Basis eines Trimers möglichen abgeschlossenen Strukturen - Hexamere, Dodekamere, 24-mere und 48-mere - findet man in der Natur.

§ Auf Grund von immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen in jüngster Z[illegible] ergibt sich das erweiterte Modell der Abb.74, Mar[illegible] persönliche Mitteilung.

2.6. Hypothetischer Assoziationsweg

Ausgehend von den experimentellen Ergebnissen läßt sich ein Assoziationsweg vorschlagen. Nach meiner Vorstellung bildet das Heterodimer bc einen " Kondensationskeim " für die Assoziation der Untereinheiten. Als erstes assoziiert Untereinheit a (sie besitzt eine große Affinität zu bc). Durch die nachfolgende Assoziation von



g,f,d und e entsteht ein Heptamer,das aus sieben verschiedenen Untereinheiten aufgebaut wird. Das Heptamer vervollständigt sich dann entweder zu einem Dodekamer, das dann zu einem 24-mer dimerisiert (I), oder assoziiert mit einem schon fertigen Dodekamer zu einem19-mer (II), einem (3x6)-Partikel,das als 28-30 S-

Hämocyanin sowohl bei der Reassoziation als auch bei der Dissoziation gefunden wurde .Die weitere Assoziation eines Satzes von Monomeren macht das 37 S-Hämocyanin vollständig. Eine dritte Möglichkeit (III), die Assoziation zweier Heptamere und die anschließende Vervollständigung zu einem 28 S-Aggregat , erscheint weniger wahrscheinlich, da ein 14-mer nicht beobachtet worden ist.
Die Assoziation eines Heptamers mit einem Dodekamer oder zweier Dodekamere erfolgt in jedem Fall punktsymmetrisch über bc-bc unter Ausbildung eines Ringes

Rest - b - c - Rest
| |
c - b - Rest,

der das Zentrum des 37 S-Hämocyanins darstellt. Außerdem wird angenommen, daß b und c unterschiedliche Affinitäten zu den übrigen Untereinheiten haben (beide unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung).

2.7. Zur Dissoziation

Einen Hinweis auf die Position der einzelnen Untereinheiten im Oligomer geben die Dissoziationsprodukte, die nach dem alkalischen Andissoziieren des nativen 37 S-Hämocyanins in der PAGE nachgewiesen wurden, besonders bei einem Vergleich mit den Ergebnissen nach Quervernetzung. Es traten vor allem Komponenten im Bereich des 18 S- und 30 S-Hämocyanins auf. Bedenkt man, daß das Dimer bc unter diesen Bedingungen stabil bleibt, muß man das 18 S-Hämocyanin als ein "Hexamer" ansehen, in welches bc in der Weise eingebaut ist, daß eine Polypeptidkette davon (b bzw. c) nach außen absteht. Gestützt wird diese Annahme dadurch, daß im Elektronenmikroskop dieses Heptamer dem 18 S-Produkt vom 24 S-Hämocyanin aus Cupiennius nach partieller Dissoziation sehr ähnelt (Markl, 1980, Markl et al., 1980). Markl

(1980) konnte die " herausragende " Untereinheit als die eine Hälfte des Dimers identifizieren.
Das 30 S-Produkt wird sowohl bei partieller Dissoziation als auch bei der Reassoziation gewonnen. Das reassoziierte Produkt ist gelelektrophoretisch und elektronenmikroskopisch von dem Produkt nach der Dissoziation nicht zu unterscheiden. Im Elektronenmikroskop ist es als eine (3x6) - Struktur erkennbar, aus welcher ein oder zwei Partikel von der Größenordnung einer Untereinheit in den Raum des vierten Hexamers hineinragen. Man kann mit hoher Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die herausstehende Untereinheit eine Hälfte des Heterodimers darstellt; als zweite Untereinheit käme vermutlich a in Frage.

Folgender Dissoziationsweg resultiert aus diesen Ergebnissen:

(a) 37 S ⟶ 30 S ⟶ 18 S ⟶ Dimere + Monomere

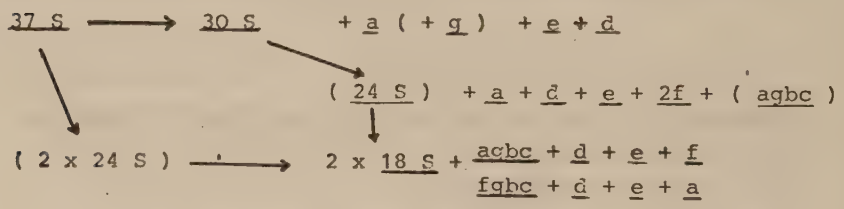
Der reguläre Aufbau des Spinnenhämocyanins aus 4 Hexameren hätte folgende Dissoziationsschritte erwarten lassen:

(b) 37 S ⟶ 24 S ⟶ 16 S ⟶ Dimere + Monomere.

Wegen der besonderen Rolle des Dimers ist dieser Weg aber nicht realisierbar; das Dimer ist jeweils zur Hälfte in zwei Hexamere eingebaut, und es hält fester zusammen als die Bindungen zwischen den 5 Monomeren eines Hexamers. Vergleichende Studien an Hämocyaninen, welche stabile Dimere bzw. keine solche enthalten, zeigten, daß bei Anwesenheit eines stabilen Dimers im nativen Molekül Weg (a), bei Nichtvorhandensein Weg (b) beschritten wird (Markl et al., 1980).
Die auftretenden Intermediate bei der limitierten Proteolyse mit Trypsin können als eine weitere Bestätigung der vorstehenden Vorstellungen angesehen werden. Als erstes tritt das bekannte 19 – 20mer auf, nachdem aus dem

nativen Partikel vor allem die außensitzende e abgebrochen wurde und offenbar, bedingt durch unzureichende Stabilität des Restpartikels, auch noch g bzw. a und d abdissoziieren. Sie erscheinen alle als Monomere. f ist hingegen noch gebunden. Das Molekül zerfällt dann rasch weiter zu dem bekannten 18 S-Hämocyanin; der weitere Zerfall erfolgt über 2 mögliche Tetramere bzw. Trimere bis zu den Dimeren und Monomeren. Dabei muß man sich der relativ stabilen Assoziate agbc und fgbc erinnern.

Das folgende Schema zeigt den angenommenen Zerfallsweg nach limitierter Proteolyse (mit Trypsin) des 37 S-Hämocyanins. Die unterstrichenen Produkte sind nachgewiesen worden (gemeinsamm mit Strych, Dissertation, 1981)



Die Tatsache, daß sich gelelektrophoretisch, elektronenmikroskopisch und auch im Molekulargewicht die Reassoziationsprodukte und die Dissoziationsprodukte völlig entsprechen, stellt eine große Stütze dafür dar, daß die Erkenntnisse, die durch Reassoziationsexperimente gewonnen wurden, auch tatsächlich auf die native Quartärstruktur übertragen werden können.

3. Zur Funktion des Hämocyanins

Um die Eigenschaften des Oligomers, die es erst durch die Aggregation der heterogenen Untereinheiten gewinnt, abschätzen zu können, wurden die Einflüsse verschiedener Parameter auf die Sauerstoffbindungsfähigkeit des 37 S-Hämocyanins untersucht. Dabei erschien es gerechtfertigt, mit einem Hämocyaningemisch aus verschiedenen Tieren zu arbeiten. Zwar waren bei acht untersuchten Proben aus einzelnen Tieren Schwankungen bei Halbsättigungsdruck und Kooperativität zu erkennen, sie waren jedoch sehr klein. Der Mittelwert war mit allen p_{50}-Werten und n_{50}-Werten, die von Hämolymphegemischen gewonnen wurden, vergleichbar (Tab.14).
Die bei den Untersuchungen zur Zusammensetzung und Quartärstruktur gefundene Homogenität des Vogelspinnenhämocyanins (Markl et al., 1980) wird auch in funktioneller Hinsicht bestätigt, die " intrinsischen " Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten für den unbeladenen und beladenen Zustand (T- und R-Zustand) waren bei Hämocyaninproben aus verschiedenen Einzeltieren immer gleich. Sie betrugen $K_{ass,T}$ = $0{,}0024574 \cdot 10^{+6}$ M^{-1} und $K_{ass,R} = 1{,}1468 \cdot 10^{+6}$ M^{-1}, der allosterische Parameter c resultiert daraus zu c = 0,00217.

3.1 Einfluß von pH, Ca^{2+}, Mg^{2+}, und Cl^-

a) Der pH-Wert hat auf die Bindungscharakteristik den stärksten Einfluß. Die Sauerstoffaffinität wird mit zunehmendem pH erhöht, die Kooperativität durchläuft ein ausgeprägtes Maximum (Loewe, 1978). Beide werden durch 4 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} (in vivo - Konzentration) nicht beeinflußt (Abb.46). Dies ist überraschend, da von vielen Hämocyaninen bekannt ist, daß Ca^{2+} und Mg^{2+} einen ausgeprägten Einfluß auf die Affinität und Kooperativität ausüben (Larimer and Riggs, 1965, Er - el et al., 1972; Miller and van Holde, 1974; Brouwer et al., 1978; Jeffrey and Treacy, 1980; Arisaka and van Holde, 1980). Ausführlichere Untersuchungen zur Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen beim Spinnenhämocyanin wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durch-

geführt. Während der T- und R-Zustand in Abwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} vom pH unabhängig sind (Loewe, 1978), wirkt sich ihre Anwesenheit jedoch auf den T-Zustand stark aus. Bei pH 7,5, dem physiologischen pH (Angersbach, 1978) ist die " intrinsische " Assoziationskonstante für die Bindung des ersten Sauerstoffmoleküls mit $K_{ass,T} = 0{,}0098 \cdot 10^{+6}\ M^{-1}$ am geringsten (Tab.15). Der R-Zustand ist davon nicht betroffen und mit $K_{ass,R} = 1{,}0989 \cdot 10^{+6}\ M^{-1}$ um das Hundertfache größer als $K_{ass,T}$ (Loewe, 1978; diese Arbeit, Tab.15). Die Abhängigkeit des T-Zustandes von bestimmten Parametern wird von mehreren Autoren beschrieben: Zolla et al. (1978) zeigten, daß sich für das ß-Hämocyanin von Helix pomatia $K_{ass,T}$ bei einer pH-Verschiebung von 7,0 auf 9,0 auf ein Zehntel vermindert. Der T-Zustand des Hämocyanins von Limulus polyphemus wird dagegen von Cl^- beeinflußt. Cl^- beeinflußt beim Hämocyanin von Eurypelma californicum weder den R- noch den T-Zustand (Abb.56). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß kinetische Untersuchungen an einzelnen Untereinheiten nur eine sehr schwache Cl^- Abhängigkeit aufzeigten (Markl et al., 1981c), während sie bei Limulus polyphemus Hämocyanin ausgeprägt ist (Brouwer et al., 1977).

3.2. Einfluß der Temperatur

Der Einfluß der Temperatur auf die Bindungseigenschaften von Hämocyaninen ist seit langem bekannt (Redmond, 1955). Die Darstellung solcher Temperaturabhängigkeiten wird allerdings sehr erschwert durch die Tatsache, daß die zur Untersuchung notwendigen Pufferlösungen, vor allem Tris/HCl-Puffer, ebenfalls eine starke pH-Abhängigkeit aufweisen. Diesem Umstand wurde durch zwei Versuchsansätze Rechnung getragen: einmal wurde der pH konstant gehalten, ein ander Mal wurde der pH von 8,00 nach Einstellung bei 20,0 C und Übergang auf die Meßtemperatur nachträglich nicht korrigiert. In beiden Fällen nimmt die Affinität mit zunehmender Temperatur (von $3{,}5^{\circ}$ bis $40^{\circ}C$) um das ca. Zehnfache ab. Die Affinitätszunahme bei abnehmender Temperatur wird von mehreren Autoren bei

verschiedenen Hämocyaninen beobachtet: z.B. beim Hämocyanin von Panulirus interruptus (Redmond, 1955), Levantina hierosolima (Er-el et al., 1972), Cancer magister (Wajcman et al., 1977), Leirus quinquestriatus (Klarman and Daniel, 1980), Helix pomatia (Zolla et al., 1981).
Die beiden Versuchsansätze wirken sich jedoch hinsichtlich der Kooperativität verschieden aus. Während beim Konstanthalten des pH-Wertes der Hillkoeffizient n_{50} von 2,4 (bei 3,5°C) auf 6,7 (bei 30°C) steigt, liegt er konstant zwischen 6 und 7, wenn der pH nicht nachkorrigiert wird. Die damit verbundene pH-Veränderung hat dabei möglicherweise einen kompensatorischen Einfluß. Allerdings ist er nicht abschätzbar. In der Literatur wird die Temperaturabhängigkeit des n_{50} nahezu nicht behandelt.
Eine mögliche Erklärung dieses Unterschiedes bietet sich an, wenn man nach Buc et al. (1973) die Anzahl N der miteinander in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten, d.h. die Größe der allosterischen Einheit berechnet: Wird der pH bei der Temperaturveränderung von außen her nicht beeinflußt, z.B. konstant gehalten, so errechnet sich N zu 8-9 (Abb.75). Wird der pH jedoch für jede Temperatur auf 8,0 eingestellt, so hat N für niedrige Tempraturen auch niedrige Werte (N = 4-5; 5 Messungen) und steigt dann mit zunehmender Temperatur auf Werte von 8-10 (Abb.75). Dabei wurde vorausgesetzt, daß keine funktionellen Hybridzustände R_iT_{N-i} existieren (Buc et al., 1973). Überlegungen dazu in der Literatur sind mir nicht bekannt.
In vivo-Messungen des pH in der Vogelspinne Eurypelma californicum (Loewe and de Eggert, 1979) zeigten, daß der pH von der Temperatur abhängt, jedoch nicht in so starkem Maße wie es der Versuchspuffer Tris/HCl in der vorliegenden Arbeit ist. Bei letzterem wurde ein Wert von $\Delta pH/\Delta T = 0{,}0356$ gefunden. Der entsprechende in-vivo Wert beträgt jedoch nur $\Delta pH/\Delta T = -0{,}0093$. Dabei wird vor allem eine stärkere Änderung des pH unterhalb von 20°C als oberhalb davon gefunden.

3.3. Thermodynamische Überlegungen

Die vollständige Oxygenierung des 37 S-Hämocyanins ist mit einem Gewinn an freier Energie $\Delta G_I = RT \ln c = -3{,}5$ kcal/mol verbunden. Der etwas höhere Betrag von -3,9 kcal/mol, wie er von Loewe (1978) ermittelt wurde, ist durch die höhere Versuchstemperatur von 25°C bedingt.
ΔG_I setzt sich sowohl aus einem Enthalpietherm ΔH und einem Entropietherm ΔS zusammen, die beide für den T- und R-Zustand unterschiedlich sind. Dies kann man - wie es Klarman et al. (1980) auch beim Hämocyanin von Leirus quinquestriatus fanden - als einen Hinweis dafür ansehen, daß dem Übergang vom T- in den R-Zustand neben einer Konformationsände - rung auch die Bildung oder das Auseinanderbrechen von nichtkovalenten Bindungen zu Grunde liegt (Perutz, 1970, zeigte dies am Säugerhämoglobin).
Thermodynamische Betrachtungen (Tab.26) zeigen, daß die Bindung des ersten Sauerstoffmoleküls (im T-Zustand) mit einer höheren positiven Entropieänderung verknüpft ist, verglichen mit der Bindung des letzten Sauerstoffmoleküls. Das bedeutet, daß das erste Sauerstoffmolekül, verglichen mit dem letzten bei der Bindung eine höhere Konformationsschwelle zu überwinden hat. Man kann also beim 37 S-Hämocyanin von Eurypelma californicum zwischen zwei Zuständen, einen affineren (Oxy-) und einem weniger affinen (Desoxy-Form) sprechen, die dem " tense " bzw. " relaxed "-Zustand im Sinne des MWC-Modells (Monod et al., 1965) entsprechen würden. Im Gegensatz zum Hämocyanin von Leirus quinquestriatus, wo die Oxygenierung im R-Zustand mit keiner Entropieänderung verbunden ist (Klarman et al., 1980), wird für das Eurypelma-Hämocyanin eine positive Entropieänderung berechnet. Allerdings ist der Konformationswechsel T → R mit einer höheren negativen Entropieänderung $\Delta S = -94{,}0$ cal/mol·grd verbunden, die um einen Faktor 4 größer ist als die, die Klarman et al.

(1980) für das Skorpionshämocyanin berechneten (ΔS = - 27,4 cal/Mol·Grad).

Tab.26 : Thermodynamische Werte für die Sauerstoffbindung des Eurypelma-Hämocyanins
Die Bedingungen waren:
o,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, c_{Hc} = o,15 mg/ml, T = 20°C.

Hämocyanin-zustand	ΔG^{o} a (kcal/Mol)	ΔH^{o} b (kcal/Mol)	ΔS^{o} (cal/Mol·Grad)
T	- 4,446	34,093 (19,058) c	131,5 (80,2) c
R	- 8,006	3,000	37,5
$O_2 - O_2$ Wechselwirkung	- 3,560	-30,907 (-15,942) c	-94,0 (-42,7) c

a) ΔG wird mittels $\Delta G^{o} = -RT \ln (\kappa p_{diss})$ gewonnen; κ ist der Bunsensche Löslichkeitskooeffizient
b) ΔH wird aus dem van't Hoff-Diagramm gewonnen (log p_{diss} vs. 1/T); dabei ist die Lösungsenthalpie für Sauerstoff berücksichtigt (-3,o kcal/Mol bei 20°C)
c) Diese Werte ergeben sich aus den Versuchen, bei denen der pH für die entsprechende Temperatur nicht nachkorrigiert wurde (siehe auch Punkt C 13.2 a und b).

3.4. Die allosterische Einheit

Von generellem Interesse bei einem kooperativen Multiproteinkomplex ist die Frage, wieviele Untereinheiten in kooperativer Wechselwirkung stehen, d.h. wie groß die allosterische Einheit ist.
Nach Monod, Wyman and Changeux (1965) ist die Beladungsfunktion eines kooperativen allosterischen Proteins:

$$y = \frac{(1 + \alpha)^{N-1} + L_o c \alpha (1 + c\alpha)^{N-1}}{(1 + \alpha)^{N} + L_o (1 + c\alpha)^{N}}$$

$$L_o = \frac{[T]}{[R]}$$

$$\alpha = \frac{pO_2}{p_{diss,R}}$$

$$c = \frac{p_{diss,R}}{p_{diss,T}}$$

Es wird dabei ein Konformationsübergang von einem Zustand T, mit niedriger Affinität, in einen Zutand R, mit hoher Affinität, angenommen, wobei jeder Zustand durch eine Protein-Liganden-Dissoziationskonstante K_{diss} (Mol) bzw. p_{diss} (Torr) charakterisiert wird. Die Gleichgewichtskonstante L_o vermittelt zwischen den T- und R-Populationen in Abwesenheit von Liganden. Bei Einwirkung von Effektoren wird L_o durch L' ersetzt. In diesem Modell hängt die Stärke der Kooperativität im Wesentlichen von den zwei Parametern L' und c ab. α ist die Ligandenkonzentration, normalisiert mit der Dissoziationskonstanten im R-Zustand. Zur Ausbildung

eines allosterischen Effekts müssen mehrere Bindungsstellen N miteinander in Wechselwirkung treten. Beim Hämocyanin entspricht eine Bindungsstelle einer Untereinheit, da jede nur eine Bindungsstelle für Sauerstoff besitzt.
K.E. van Holde hat folgende Umformulierung vorgeschlagen (persönliche Mitteilung):

(1) $$S = \frac{y}{1-y} = \frac{\alpha (1 + \alpha)^{N-1} + L' c \alpha (1 + c\alpha)^{N-1}}{(1 + \alpha)^{N-1} + L' (1 + c\alpha)^{N-1}}$$

$$\frac{S}{\alpha} \left(1 + L' \left(\frac{(1 + c\alpha)}{(1 + \alpha)} \right)^{N-1} \right) = 1 + c L' \left(\frac{1 + c\alpha}{1 + \alpha} \right)^{N-1}$$

$$L' \left(\frac{1 + c\alpha}{1 + \alpha} \right)^{N-1} \left(\frac{S}{\alpha} - c \right) = 1 - \frac{S}{\alpha}$$

$$L' \left(\frac{1 + c\alpha}{1 + \alpha} \right)^{N-1} = \frac{1 - \frac{S}{\alpha}}{\frac{S}{\alpha} - c}$$

Wenn nun das MWC-Modell erfüllt wird, so sollte eine Darstellung $\log \frac{1+\alpha c}{1+\alpha}$ vs. $\log \frac{1-S/\alpha}{S/\alpha - c}$ eine Gerade liefern, die die Steigung (N-1) besitzt. (Die experimentellen Daten sind zwischen 5 und 95 % Sättigung sehr gut ermittelbar).

( ) $$\log L' + (N-1) \log \frac{1 + c\alpha}{1 + \alpha} = \log \frac{1 - \frac{S}{\alpha}}{\frac{S}{\alpha} - c}$$

(3) Mit $\lim_{\alpha \to 0} \log L$ ergibt sich : $\log \frac{1-S/\alpha}{S/\alpha - c} = \log L'_o$

L'_o ist dabei die allosterische Konstante in Abwesenheit von Liganden (im Rahmen des " van-Holde-Diagramms ").

Eine weitere Möglichkeit zur Berechnung von N bietet sich nach Buc et al. (1973) an. Dabei ist N mit n_{max} durch folgende Gleichung miteinander verknüpft:

(4) $$n_{H,max} = 1 + (N-1) \left(\frac{1-\sqrt{c}}{1+\sqrt{c}} \right)^2 .$$

Dabei wird angenommen, daß keine Hybride $R_i T_{N-i}$ existieren. Tatsächlich ergibt sich bei T = 20°C und pH 8,0 für die Hämocyaninproben aus Einzeltieren im Diagramm nach van Holde eine Gerade mit der Steigung (N-1) (Abb.76). Für die einzelnen Werte läßt sich dabei ein Mittelwert von N = 8,33± 0,39 (i = 8) berechnen. N nimmt Werte von 7,7 bis 8,8 an. Nach Buc et al.(1973) errechnet sich aus c = 0,00217 ein N = 8,59 (wobei kein Hybrid angenommen wurde). Aus beiden Werten resultiert eine allosterische Einheit des 37 S-Hämocyanins bei pH 8,0 und 20°C mit wenigstens N = 9 Untereinheiten.
N ist dabei abhängig von der Temperatur und dem pH. Wird die Temperatur verändert und der pH dabei konstant gehalten, so steigt N von 6 bei T = 3,5 °C auf 9 bei T = 20°C und bleibt dann konstant, d.h. im ersten Fall ist die allosterische Einheit ein Bereich von 6 Untereinheiten, unter Umständen ein Hexamer, wie es im Elektronenmikroskop sichtbar ist, bei hohen Temperaturen ist es ein 3/4 Dodekamer. Korrigiert man den pH jedoch mit steigender Temperatur der Lösung nicht, sondern läßt ihn absinken, so bleibt die Anzahl der miteinander in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten bei N = 8-9 (Abb.75). Unter physiologischen Gesichtspunkten könnte man dies so deuten, daß das Eurypelmahämocyanin die Fähigkeit zu einer " funktionellen Autoregulation " besitzt.

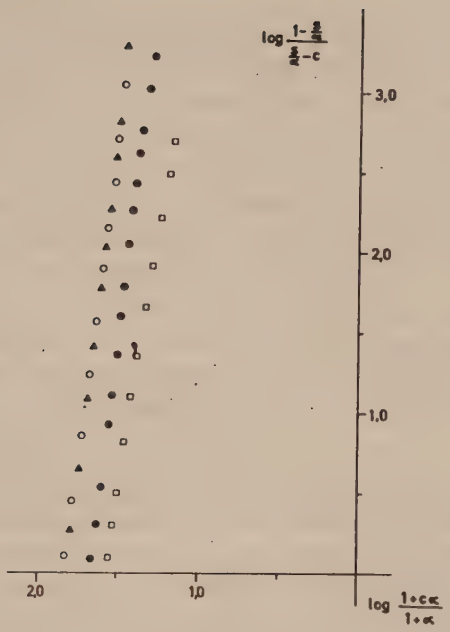


Abb.76: "Van-Holde"-Diagramm der Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins einzelner Tiere.
Dazu wurde die Gleichung, die aus dem MWC-Modell (Monod et al., 1965) resultiert:

$$S = \frac{y}{1 - y} = \frac{\alpha(1+\alpha)^{N-1} + L' c \alpha (1 + c\alpha)^{N-1}}{(1+\alpha)^{N-1} + L' (1 + c\alpha)^{N-1}}$$

umgeformt:

$$\log L' + (N-1) \log \frac{1+c\alpha}{1+\alpha} = \log \frac{1 - \frac{S}{\alpha}}{\frac{S}{\alpha} - c}$$

Das Diagramm ist eine doppellogarithmische Darstellung dieser Gleichung. Die Steigung der Geraden ist N-1 ; N = Zahl der miteinander in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten; der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ergibt log L'_o ; L'_o = allosterische Gleichgewichtskonstante.
Den Berechnungen liegt der allosterische Parameter c = 0,00217 zu Grunde, der mit Hilfe des modifizierten Scatchard-Diagramms gewonnen wurde (siehe Abb. 45).

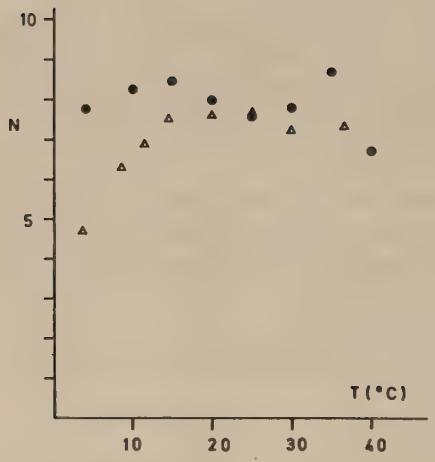


Abb.75: Abhängigkeit der Größe der allosterischen Einheit (wiedergegeben durch die Zahl N der in Wechselwirkung tretenden Untereinheiten) von der Temperatur.
Die Berechnung von N erfolgte nach Buc et al. (1973) mit der Annahme, daß keine Hybride R_iT_{N-i} existieren. Für ▲ betrug der pH bei allen Temperaturen 8,0; für ● wurde der pH bei 20,0 °C auf 8,00 eingestellt und für die untersuchten Temperaturen nicht korrigiert.
Die Messungen erfogten in Tris/HCl-Puffer, c_{Hc} = 0,15 mg/ml.

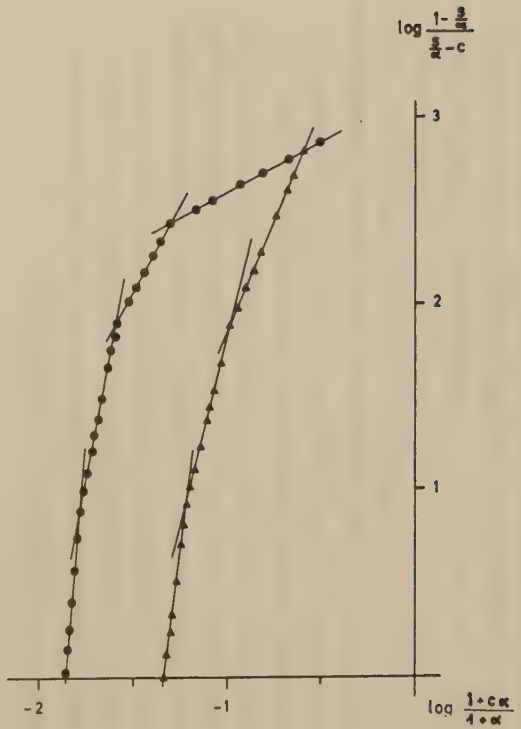
3.5. Einfluß der fortschreitenden Oxygenierung auf die allosterischen Eigenschaften

Während der Untersuchung des Einflusses des pH auf die Sauerstoffbindung (bei konstanter Temperatur und der Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+}) wurde ein überraschender Zusammenhang aufgedeckt: Die Größe der allosterischen Einheit nimmt unter diesen Bedingungen von N = 3 mit fortschreitender Oxygenierung des Oligomers auf N ≈ 11 zu. Im " van Holde-Diagramm " erscheinen die Kurven aus Geraden mit unterschiedlicher Steigung (N-1) zusammengesetzt (Abb.77).
Korreliert man die Orte der sprunghaften Erhöhung mit **v**, der Anzahl der im Durchschnitt beladenen Untereinheiten, und stellt sie in Abhängigkeit von N dar, so gewinnt man Abb.78

Mit zunehmendem pH erhöht sich nach der Bindung des ersten Sauerstoffmoleküls die Anzahl der miteinander in Wechselwirkung stehenden Untereinheiten N. N hat dabei über einen weiten Beladungsbereich von ν = 5-19 den Wert von ca. 6. Erst wenn mehr als ν = 17 Untereinheiten Sauerstoff gebunden haben, nimmt die allosterische Einheit eine Größe an, die über einem Hexamer, jedoch nicht über einem Dodekamer liegt. Für alle pH Werte liegen die Sprungstellen für N bei ν=3-4, 6-8, 11-12, 17-20. Tetramere, Hexamere, Oktamere, Dodekamere und 17-20-mere waren aber gerade bei Reassoziatons- und Dissoziationsversuchen die auffälligsten Aggregationsstufen. Die genaue Analyse dieses Zusammenhanges wird Ziel nachfolgender Arbeiten sein.

Problematisch ist die Diskussion der allosterischen Konstanten L. Sie läßt sich für jeden Punkt der Kurve nach Gleichung (2), S.167, berechnen. Da (N-1) als zusätzliche Meßvariable eingeht, spiegeln sich die Sprünge in N auch in L wieder. Man muß dieses L von dem Wert L' im Sinne von Monod et al., (1965) unterscheiden, wo L' als Gleichgewichtskonstante zwischen (T) und (R)-Konzentration der unbeladenen Moleküle in beiden Konformationszuständen definiert wird. Im Folgenden soll das variable $\hat{L}=L'(N)$ als L'_o bezeichnet werden. Der Wert log L'_o wächst mit fortschreitender Oxygenierung um das doppelte (bei pH 8,2) bis siebenfache (bei pH 7,5) und nimmt Werte von 2 - 17 an (Tab.27). Die Abhängigkeit des maximal ermittelten log L'_o vom pH zeigt Abb.79

Die Betrachtung von L'_o als variabler Größe könnte in folgendem Zusammenhang sinnvoll sein: Ein hoher Wert von L'_o bedeutet, daß der T-Zustand, also die weniger sauerstoffaffine Konformation bevorzugt ist, d.h. daß die Tendenz Sauerstoff abzugeben groß ist. Das bedeutet wiederum, daß im unbeladenen Zustand bei einem kleinen Wert von L'_o eine größere Wahrscheinlichkeit besteht, Sauerstoff zu binden als bei einem großen Wert von L'_o. Ist im beladenen Zustand der Wert von L hoch, so kann das als Vorteil angesehen werden, da die Wahrscheinlichkeit der Desoxygenierung erhöht ist.



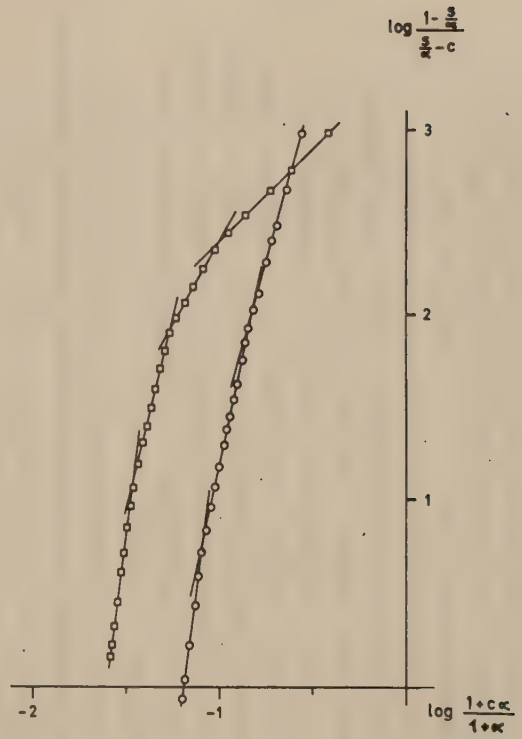


Abb.77: " Van Holde "-Diagramm der Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins bei unterschiedlichem pH in Gegenwart von 1mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+}. Zur weiteren Erklärung siehe Abb.46 .
Die Werte für c ergeben sich aus Abb. 47:
für pH 8,20, c = 0,0201, O; für pH 8,05, c = 0,0208, ▲ ; für pH 7,80, c = 0,0141, □ ;

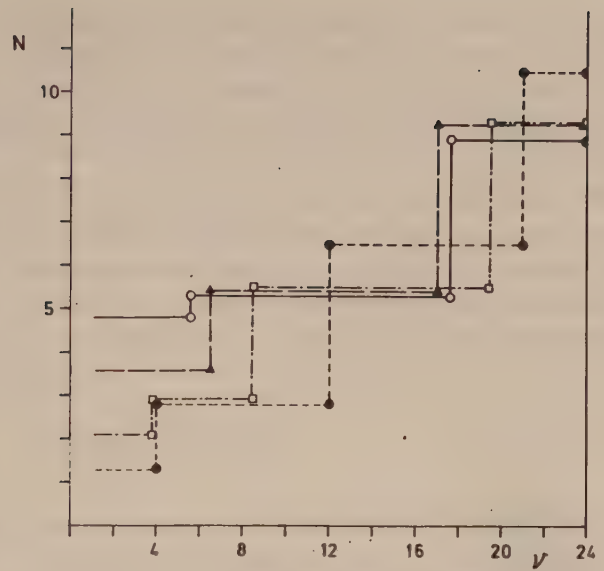


Abb.78: Abhängigkeit der Zahl N der in Wechselwirkung tretenden Untereinheiten vom Oxygenierungszustand $\bar{\nu}$ des 37 S-Hämocyanins bei verschiedenen pH-Werte. Die N-Werte wurden mit Hilfe eines von van Holde (persönliche Mitteilung) vorgeschlagenen Diagramms (Abb.77) gefunden. pH-Werte: ○ = 8,20; ▲ = 8,05; □ = 7,80; ● = 7,5.

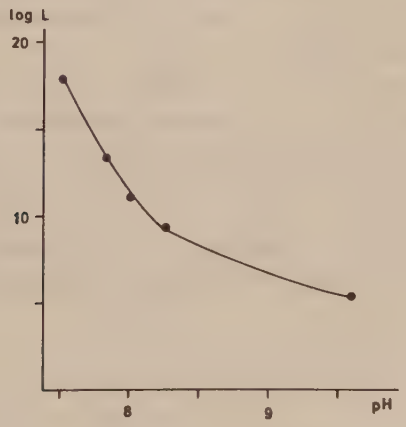


Abb.79: Abhängigkeit des Logarithmus der maximalen allosterischen Gleichgewichtskonstanten L_o (wie sie sich aus dem "van-Holde"-Diagramm der Abb.77 ergeben) in Abhängigkeit vom pH. Bedingungen siehe Abb.46 . Der Versuch, der dem Wert bei pH 9,6 zu Grunde liegt, wurde in Glycin/NaOH-Puffer, I = 0,05, in Gegenwart von 1mM Mg^{2+} und 4mM Ca^{2+} durchgeführt (vgl. Abb. 48).

Die Energieänderung bei einem Konformationswechsel von T nach R läßt sich $\Delta G_t = RT \ln L$ berechnen (Wyman, 1965; Edelstein, 1975; Chien and Mayo, 1980). Sie repräsentiert die Energie für den " quaternary constraint " (Edelstein, 1975).
Bei hohem L_o' wird also ein größerer Energiebetrag aufgewendet werden müssen, um von dem T- in den R-Zustand zu wechseln. Andererseits muß bei der Oxygenierung noch eine andere Energieform berücksichtigt werden, die freie Energie der Wechselwirkung ΔG_I. Sie ergibt sich nach Imai (1973) aus :

$$\Delta G_I = RT \ln \frac{k_i}{k_j} \quad , \qquad \text{wobei } i \neq j \text{ gilt.}$$

Dabei sind k_i und k_j die intrinsischen Assoziationskonstanten für den i-ten bzw. j-ten Oxygenierungsschritt.§
ΔG wird maximal, wenn gilt:

$$\Delta G_I = RT \ln \frac{k_1}{k_n} = RT \ln \frac{k_{ass,T}}{k_{ass,R}} = RT \ln c$$

Da bei positiver Kooperativität $k_i < k_j$ mit $j \geq i + 1$ immer gilt, ist $\Delta G < 0$, d.h. es wird Energie frei.

Der jeweilige Einfluß von ΔG_I and ΔG_t mit fortschreitender Oxygenierung soll für das Eurypelma-Hämocyanin bei dem physiologischen pH der Vogelspinnen, pH 7,5 (Angersbach,

---

§ Die einzelnen k_i-Werte lassen sich nach Imai (1973) aus den MWC-Parametern c,L und $K_{ass,R}$ berechnen:

$$k_i = \frac{Lc^i + 1}{Lc^{i-1} + 1} \; K_{ass,R}$$

Dabei ist $K_{ass,R}$ die intrinsische Assoziationskonstante des R-Zustandes, die für jeden Schritt als gleich angenommen wird.

1978) dargestellt werden (Abb.80). Dabei stellt man fest, daß die ersten 4 Beladungsschritte energetisch begünstigt sind, da die Summe $\Delta G_I + \Delta G_t < 0$ ist. Bis zur Beladung des " halben " 37 S-Hämocyanins ist die Summe ungefähr Null, danach wird sie größer als Null. Das bedeutet, daß für die Beladung der zweiten Hälfte des Hämocyanins Energie aufgewendet werden muß.

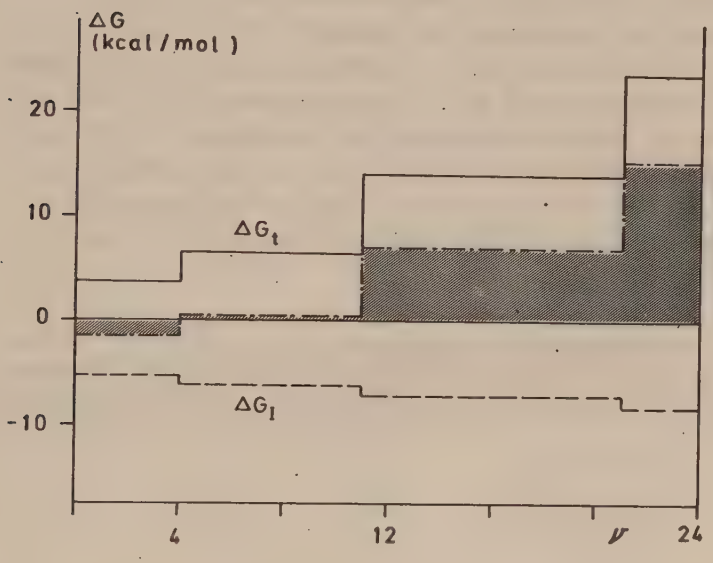


Abb.80: Abhängigkeit der "freien Energie der Wechselwirkung" $\Delta G_I = RT \ln c$ und der freien Energie des " quaternary constraint " $\Delta G_t = RT \ln L$ (Edelstein, 1975) in Abhängigkeit vom Oxygenierungszustand bei pH 7,5. Die Sprungstellen ergeben sich aus Abb.77 Die entsprechenden Werte für L wurden mit der Gleichung (3), S.167 , ermittelt. —·—·— stellt die Summe $\Delta G_I + \Delta G_t$ dar

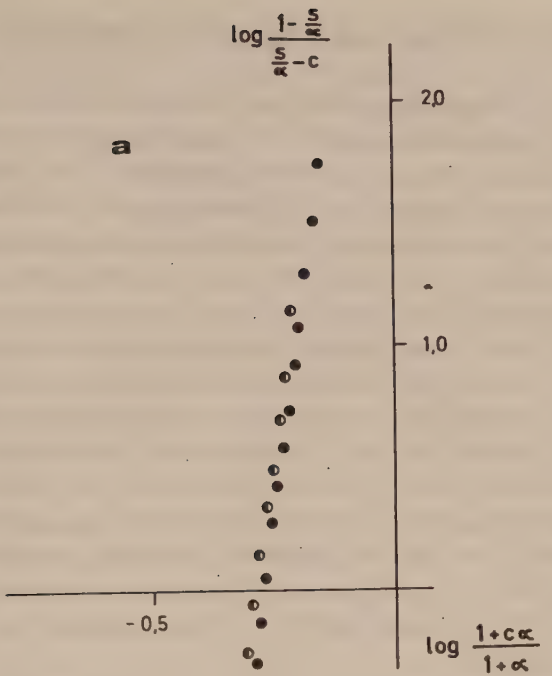
Interessant erscheint mir ein Vergleich mit den in vivo gemessenen pO_2-Werten zu sein: Im Ruhezustand beträgt der arterielle pO_2 = 28 Torr, das Hämocyanin ist zu 50% gesättigt; während der venöse pO_2 = 13 Torr beträgt, also etwa 1/4 des Moleküls beladen ist (Angersbach, 1978). In diesem pO_2-Bereich, der dem ν-Bereich von ν = 6-12 entspricht, ist die Summe $\Delta G = \Delta G_I + \Delta G_t \approx 0$.

Äußerst überraschende Ergebnisse lieferten Betrachtungen über die allosterische Einheit am 37 S-Hämocyanin,das in verschiedenen Oxygenierungszuständen quervernetzt, d.h. "funktionell" biochemisch "eingefroren" wurde. Wird das Molekül im desoxygeniertem Zustand fixiert, so gewinnt man im "van Holde-Diagramm" eine Gerade, die eine Steigung von N-1 > 13 besitzt (Abb.81); es wurden sogar Werte von 21 gefunden. Die Sauerstoffbindung von Hämocyanin, das in jedem anderen Oxygenierungszustand quervernetzt wurde, stellte sich im "van Holde-Diagramm" wieder als zusammengesetzte Geraden unterschiedlicher Steigungen dar (Abb.81).

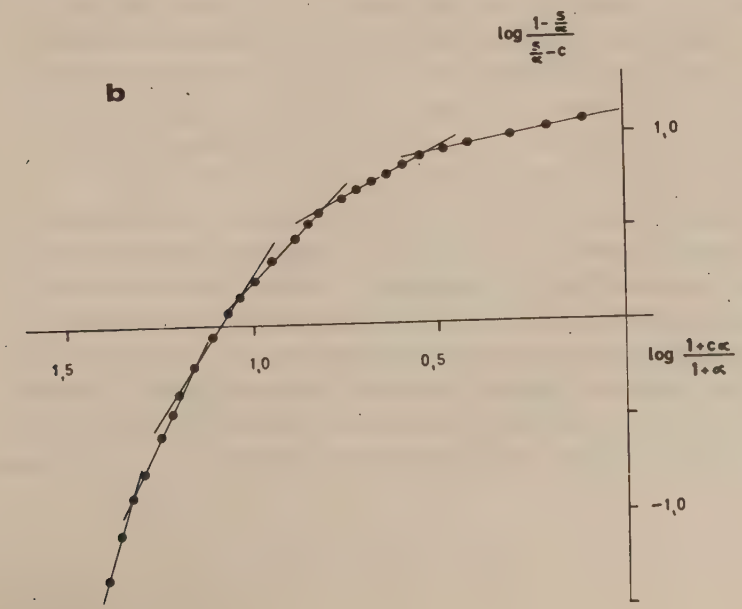
Tab.27:Die allosterische Gleichgewichtskonstante L_o' für die unterschiedlichen Oxygenierungsbereiche ν bei verschiedenen pH-Werten. Log L_o' wird nach Gleichung (3), Seite 167, berechnet; die Knickstellen entsprechen denen in Abb.77.

pH	ν-Bereich	log L_o'	N §
8,20	< 5,6	5,19	4,8
	5,6-17-5	5,56	5,3
	> 17,5	9,49	8,97
8,05	< 6,5	4,32	3,6
	7,0-17,0	6,43	5,5
	> 17,0	11,05	9,3
7,80	< 3,8	3,43	2,1
	3,8-8,5	4,24	2,8
	8,5-19,5	7,50	5,4
	> 19,5	13,25	9,3
7,50	< 4,0	2,71	1,3
	4,0-12,0	4,85	2,8
	12,0-21,0	10,61	6,5
	> 21,0	17,76	10,6

§ wurde aus dem "van Holde-Diagramm" in Abb.77 ermittelt.



bb.81: " Van Holde"-Diagramm der Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins, as im desoxygenierten (a) und im 5% Oxygenierungszustand (b) mit Di-ethylsuberimidat quervernetzt wurde.
ie Bedingungen waren wie bei Abb.71.



3.6. Struktur-Funktionsbeziehungen bei Hämocyaninen

Bonaventura and Bonaventura stellten 1980 die Frage " Why should the arthropods go through the genetic and metabolic "trouble" of making many types of substances? " und beantworteten sie damit, daß die verschiedenen Untereinheiten eine ganz spezifische Rolle bei der Assoziation zum Oligomer spielen würden (Bonaventura et al., 1975, 1977; Schutter et al., 1977, Bijlholt et al., 1979). Während diese Annahme durch Reassoziationsexperimente mit säulenchromatographisch isolierten Fraktionen gestützt wurde, die aber - wie wir heute wissen - fast alle wiederum aus mehreren verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt waren, konnte sie im Rahmen meiner Arbeit durch Experimente mit individuellen hochreinen Polypeptidketten stark untermauert werden. Inwieweit die Heterogenität der Untereinheiten darüberhinaus für die Funktion von Hämocyaninen von Bedeutung ist, läßt sich noch nicht klar beantworten. Z.B. ist bei den Hexameren von Cupiennius (Loewe et Linzen, 1975), Penaeus (Brouwer et al., 1977), und Callianassa (Arisaka and van Holde, 1979) eine zum Teil hohe Kooperativität (bis zu $n_H = 5$) nachgewiesen. Als allosterische Einheit wurde für das Callianassa-Hämocyanin (Miller and van Holde, 1974; Arisaka and van Holde, 1979) und für das Penaeus-Hämocyanin (Brouwer et al., 1977) das Hexamer angenommen. Von Crustaceenhämocyaninen sind größere Hillkoeffizienten als 5-6 nicht bekannt.
Von speziellem Interesse ist in diesem Zusammenhang das 39 S-Hämocyanin von Callianassa, bei dem die Größe der allosterischen Einheit nicht über ein Hexamer hinausgeht. Es ist allerdings, verglichen mit dem Eurypelma-Hämocyanin nach einem anderen Prinzip aufgebaut, als die sonstigen bekannten 24-meren Hämocyanine: die 4 Hexamere sind nicht in einem Rechteck sondern tetraedrisch angeordnet. Im Falle des Callianassa-Hämocyanins liegt ein Gleichgewicht zwischen Hexameren und 24-meren vor, das von den Konzentrationen von Ca^{2+} und Mg^{2+} reguliert wird. Es ist vorstellbar, daß diese

Ionen nicht als Bindeglieder für kooperative Wechselwirkung von einem Hexamer zum nächsten fungieren können. Im Gegensatz dazu wird bei Eurypelma-Hämocyanin die Verknüpfung zwischen zwei Hexameren über ein stabiles Dimer hergestellt, von dem jeweils eine Untereinheit in jedem Hexamer sitzt. Da sich die kooperative Wechselwirkung über ca. 9 Untereinheiten erstreckt, muß das Dimer bc als Träger für funktionelle Eigenschaften wie z.B. der Kooperativität dienen. Stark gestützt wird diese Hypothese durch die funktionellen Analysen von Reassoziationsprodukten: Hexamere besaßen nur dann Kooperativität, wenn bc eingebaut worden war. Die andere, für die Verknüpfung zweier Hexamere wichtige Untereinheit a scheint eine solche funktionelle Rolle nicht zuzufallen, da auch in Abwesenheit von a kooperative Hexamere gewonnen werden konnten. Dem Dimer bc kommt also zugleich eine strukturelle Rolle (Stabilität des Oligomers) und eine funktionelle Rolle (Stabilität der allosterischen Einheit und Überträger der Kooperativität) zu.
Eine funktionelle Rolle läßt sich auch der Untereinheit e zuschreiben. Zwar kann in ihrer Abwesenheit 37 S-Hämocyanin, wenn auch nur eine labile Form, aufgebaut werden, jedoch besitzt dieses Oligomer keine Kooperativität. Allerdings liegt die Affinität in der Größenordnung des nativen 37 S-Hämocyanins. Durch ihre Eckposition könnte Untereinheit e für eine " Spannung " im 37 S-Partikel veranwortlich sein, welche das Umschnappen zwischen den zwei Konformationszuständen R und T beeinflußt.

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der limitierten Proteolyse am 37 S-Hämocyanin. Schon nach 90 Minuten ist die Kooperativität nahezu ganz verloren, obwohl noch über 50-70% Aggregate von der Größenordnung zwischen Dodekamer und 24-mer vorliegen. Da Untereinheit e und Untereinheit b sehr früh von Trypsin gespalten werden (Strych, 1981) und e in der Folge davon aus dem 37 S-Verband her-

ausbricht, verliert das Restpartikel die angenommene Spannung. Andererseits muß man davon ausgehen, daß zur Ausbildung der Spannung im T-Zustand vollständig intakte Polypeptidketten erforderlich sind. Werden sie gespalten, geht die Spannung des T-Zustandes verloren, selbst wenn die Fähigkeit zu reversibler Sauerstoffbindung noch prinzipiell erhalten bleibt. Abb.64 demonstriert diesen Vorgang sehr gut.

Für funktionelle Untersuchungen bietet sich auch der Einsatz von " cross-linking " -Reagenzien an. Es konnten damit verschiedene Zwischenstufen fixiert werden, darunter auch solche, die bei der Dissoziation besonders auffällig sind (19-mere, Heptamere und Tetramere). Je nach eingesetztem Reagenz lassen sich überwiegend kleinere oder größere Aggregate isolieren (Abb.33). Nach Reaktion mit z.B. Dimethylsuberimidat konnten drei sehr eng laufende Banden mit 7-9 Untereinheiten als Hauptprodukt identifiziert werden. Dies entspricht der Größe der allosterischen Einheit. Durch genauere Untersuchungen eines solchen Aggregats sollten die Zusammensetzung und die Funktion dieser allosterischen Einheit geklärt werden können.
Während es van Driel und van Bruggen (1974) beim Hämocyanin aus Helix pomatia gelang, sowohl den R-Zustand als auch den T-Zustand zu fixieren, konnte das Eurypelmahämocyanin nur im T-Zustand durch Quervernetzung " eingefroren " werden. Quervernetzung behindert offensichtlich den Konformationswechsel, welcher für die homotrope Wechselwirkung zwischen den Sauerstoffbindungsstellen verantwortlich ist. Im Vergleich dazu geht die homotrope Wechselwirkung auch bei der Aspartattranscarbamylase durch Quervernetzung mit Tartryldiazid verloren, während aber die heterotrope erhalten bleibt (Chan and Enns, 1979).
Interessant ist die Fixierung des T-Zustandes vor allem auch deshalb, weil bei allen Untersuchungen des Hämocyanins nur der T-Zustand sich als modulierbar (durch H^+, Cl^- etc.) erwiesen hat. Die Fixierung von funktionellen Hybriden durch Quervernetzung in einem bestimmten Oxydationszustand ist unter diesen Bedingungen nicht gelungen. Bei allen Proben, die in verschiedenen Oxygenierungszuständen durch Quervernetzung fixiert worden waren, wurden anschließend Bindungs-

kurven erhalten, die von denen des nativen Hämocyanins nur durch eine Linksverschiebung im Hillplot unterschieden waren (d.h. n_{50} und c waren nur wenig verändert).

E. Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zur Quartärstruktur und Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins aus der Vogelspinne Eurypelma californicum beschrieben. Dazu wurden Dissoziations- und Reassoziationsversuche durchgeführt. Sauerstoffbindungskurven wurden in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern für das 37 S-Hämocyanin, sowie von isolierten Untereinheiten und von Reassoziationsprodukten gewonnen.
2. Das Reassoziationsverhalten des Hämocyanins wurde in Abhängigkeit von der Temperatur, pH, Proteinkonzentration, Konzentration von Ca^{2+} und Mg^{2+} und der Ionenstärke untersucht.
   a) Die Temperatur (4^{o} bis 25^{o}C) und der pH (untersuchter Bereich: 7,5 bis 8,0) haben keinen signifikanten Einfluß.
   b) Der zeitliche Reassoziationsverlauf läßt sich durch eine anfänglich sehr rasche Zunahme an 37 S-Hämocyanin (bis ca. 70% innerhalb von 18 h) charakterisieren, welcher von einem nur noch sehr schwachen weiteren Anstieg gefolgt wird.
   c) Für die korrekte Reassoziation des 37 S-Hämocyanins der Vogelspinne Eurypelma californicum ist die Anwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} nicht erforderlich.
   d) In Gegenwart von Ca^{2+} und Mg^{2+} werden neben 37 S-Partikeln 16 S-Material gebildet, das jedoch nicht Zwischenstufen darstellt, sondern als Fehlassoziat erkannt wurde.
   e) Mit zunehmender Ionenstärke erreicht die Ausbeute an reassoziierten 37 S-Partikeln ein Maximum (bei I = 0,1 bis 0,5). Bei der hohen Ionenstärke von I = 1,0 liegen neben den Monomeren nur 16 S- Reassoziate vor (ca. 50%
3. Um die Bedeutung der einzelnen Untereinheiten für den Aufbau des 37 S-Hämocyanins zu ermitteln, wurden Reassoziationsversuche mit einzelnen Untereinheiten und Kombinationen aus zwei, drei, vier etc. verschiedenen Untereinheiten durchgeführt. Der Reassoziationserfolg wurde mit Hilfe der Dünnschichtgelchromatographie, durch ana-

lytische Ultrazentrifugation, Elektronenmikroskopie und Gelelektrophorese analysiert.

a) Keine Untereinheit ist (bei 2 mg Protein / ml) alleine zur Reassoziation fähig.

b) Selbst zur Bildung von Hexameren müssen wenigstens drei verschiedene Untereinheiten gegenwärtig sein.

c) Dodekamere werden nur gebildet, wenn das Heterodimer bc und zusätzlich Untereinheit a im Reassoziationsgemisch sind.

d) Der Aufbau von (3x6)- und (4x6)-Strukturen erfordert darüber hinaus die Anwesenheit von f und g.

e) Ein komplettes Hämocyanin-Partikel kann aus allen Untereinheiten minus e gebildet werden; es ist jedoch instabil.

f) Zum Aufbau des stabilen 37 S-Hämocyanins sind sämtliche 7 verschiedenen Untereinheiten gleichzeitig erforderlich.

g) Ausgehend von den Ergebnissen wurde ein Modell des Hämocyanins entworfen und ein Schema für den Assoziationsweg erstellt.

4. Nach kurzzeitiger Dissoziation oder nach kurzzeitiger limitierter Proteolyse des nativen 37 S-Hämocyanins lassen sich " irreguläre " Zwischenprodukte mit 19 Untereinheiten (28 - 30 S) und 7 Untereinheiten (18 S) nachweisen.

5. 37 S-Hämocyanin läßt sich mit verschiedenen bifunktionellen Imidaten quervernetzen. Durch Variation der Versuchsbedingungen ließen sich Aggregate verschiedener Größenordnung in größeren Mengen herstellen.

6. Von den isolierten Untereinheiten wurden Sauerstoffbindungskurven bei verschiedenen pH-Werten zwischen 6,5 und 9,6 aufgenommen. Die Untereinheiten unterscheiden sich funktionell nicht signifikant. Die Affinitäten sind mit p_{50} = 5 - 6 Torr, bei pH 8,0, mindestens doppelt so hoch wie beim nativen 37 S-Hämocyanin. Eine Kooperativität ist erwartungsgemäß nicht vorhanden, ebensowenig ein Bohreffekt. Die Untereinheit d scheint etwas

affiner als die anderen zu sein. Die Bindungsenthalpie liegt für alle Untereinheiten bei ca. $\Delta H = 10{,}168$ kcal/mol.

7. Hämocyaninproben aus einzelnen Tieren schwanken in Affinität und Kooperativität geringfügig. Im Mittel ergibt sich $p_{50} = 13{,}82 \pm 2{,}78$ Torr und $n_{50} = 7{,}09 \pm 0{,}33$. Die Werte entsprechen den gemischten Proben aus vielen Tieren
8. Die Sauerstoffbindung des 37 S-Hämocyanins ist von verschiedenen Parametern abhängig:
   a) Vom pH in Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+}; die Affinität liegt zwischen $p_{50} = 28{,}18$ und 5,17 Torr (bei pH 7,00- 8,20); die Kooperativität erreicht Werte von ca. 6 (bei pH 8,05); der Bohreffekt liegt bei $\Delta \log p_{50} / \Delta$ pH = -1,1.
   b) Eine Abhängigkeit von NaCl konnte nicht nachgewiesen werden.
   c) Mit zunehmender Temperatur wird die Sauerstoffaffinität vermindert.

   Die Kooperativität erhöht sich (bei pH 8,0) von $n_{50} = 2{,}5$ ($T = 3{,}5^{\circ}C$) auf $n_{50} = 7$ ($T = 35^{\circ}C$). Wurde ein pH von 8,0 bei 20°C eingestellt und bei den Versuchstemperaturen nicht koorigiert, so ist die Affinitätsänderung qualitativ und quantitativ wie oben, jedoch lag die Kooperativität für alle Temperaturen konstant bei 6 - 7. Dies könnte vielleicht dem physiologischen Verhalten des Blutes entsprechen.
   d) 2,3 - DPG hat keinen Einfluß auf die Sauerstoffbindung. Ebensowenig beeinflußt Malat (1 mM) die Affinität. Dagegen senkt 100 mM Succinat dem p_{50} auf 2,75 Torr; ein leichter Effekt ließ sich schon bei 5 mM Succinat nachweisen.
9. Es wurde versucht, die Sauerstoffbindung des Hämocyanins im Rahmen des MWC - Modells zu beschreiben.
   a) Mit Hilfe eines modifizierten Scatchard-Diagramms konnte gezeigt werden, daß die Assoziationskonstanten

für den T- und R-Zustand für die Hämocyaninproben aus verschiedenen Individuen gleiche Werte haben; $K_{ass,T} = 0{,}0024574 \cdot 10^{+6}\ M^{-1}$; $K_{ass,R} = 1{,}1468 \cdot 10^{+6}\ M^{-1}$; der allosterische Parameter ergibt sich zu c = 0,00217.

Die geringere Affinität des Sauerstoffs im T-Zustand gegenüber dem R-Zustand ist dadurch bedingt, daß die Entropieänderung ΔS = 131,5 cal/Mol·Grad bei 20°C positiver ist als ΔS = 27,5 cal/Mol·Grad. Das Überwinden einer Konformationshürde bei der Assoziation des ersten Sauerstoffmoleküls, gestaltet sich im T-Zustand schwieriger als im R-Zustand. Die freie Energie der Wechselwirkung ΔG_I beträgt -3,5 kcal/Mol bei 20°C. Die freie Energie für den ersten und letzten Assoziationsschritt liegt bei -4,5 kcal/Mol bzw. -8,0 kcal/Mol.

b) Der T-Zustand ist in Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} und 4 mM Ca^{2+} vom pH abhängig, der R-Zustand nicht. Der T-Zustand ist auch temperaturabhängig, der R-Zustand nicht. Cl^- und 2,3 - DPG beeinflussen weder den T- noch R-Zustand.

10. Das MWC-Modell in seiner ursprünglichen Form versagt bei der Beschreibung der Sauerstoffbindung, wenn die Einflüsse des pH in Gegenwart von 4 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} oder der Temperatur untersucht werden. Eine von Prof. K.E. van Holde vorgeschlagene Auftragsweise der MWC-Gleichung

$$\log \frac{1 - S/\alpha}{S/\alpha - c} \text{ vs.} \log \frac{1 + c\alpha}{1 + \alpha}$$ ergibt unter den gemessenen Sauerstoffbindungskurven nur für die Hämocyaninproben aus einzelnen Tieren (also ohne Reinigungsschritte) Geraden mit der Steigung N -1 (N ist dabei die Anzahl der Untereinheiten, die die allosterische Einheit aufbauen). Ihre Größe liegt mit N = 8-9 zwischen einem Hexamer und einem Dodekamer. Bei den übrigen Messungen am Gesamthämocyanin erscheint die Gerade mehrmals geknickt. Die Knickstellen ließen sich mit dem Sauerstoffbeladungszustand des Oligomers korrelieren. Sie treten vorzugs-

weise auf, wenn 3-4, 6-8, 12-14 und 18-20 Untereinheiten beladen sind.
37 S-Hämocyanin, das im desoxygenierten Zustand mit Dimethylsuberimidat quervernetzt wurde, liefert im "van Holde-Diagramm" eine Gerade mit der Steigung N-1 = 14-20; von einem 37 S-Hämocyanin, das in irgendeinem sonstigen Oxygenierungszustand quervernetzt wurde, erhält man eine Gerade mit mehreren Knickstellen. Es wird gefolgert, daß mit steigender Beladung Hybridzustände ($T_i R_{N-i}$) auftreten, die das MWC-Modell nicht enthält.

11. Es wurden Sauerstoffbindungskurven von isolierten Reassoziationsprodukten aufgenommen. Nur in Gegenwart von bc (und wahrscheinlich e) ist Kooperativität nachweisbar. 37 S-Hämocyanin ohne e ist nicht kooperativ und besitzt einen p_{50} von 10 Torr. Reassoziate in der Größenordnung von (1x6)- Partikeln mit eingebautem bc sind kooperativ ($n_{50} = 1,8$), solche ohne bc nicht ($n_{50} = 1,0$).

Adair GS (1925): The hemoglobin system VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. J Biol. Chem. 63, 529-545.
Angersbach D (1978): Oxygen transport in the blood of the tarantula Eurypelma californicum pO_2 and pH during rest, activity and recovery.IJ. comp. Physiol. 123, 113-125.
Arisaka F, Holde KE van (1979): Allosteric properties and association equilibria of hemocyanin from Callianassa californiensis. J Mol. Biol. 134, 41-73
Berg AA van den, Gaastra W, Kuiper HA (1977): Heterogenecity of Panulirus interruptus hemocyanin. (in Structure and function of hemocyanin. (in Bannister J. ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.)
Bijlholt MMC, Bruggen EFJ van, Bonaventura J (1979): Dissociation and reassembly of Limulus polyphemus hemocyanin. Eur J Biochem 95,399-405.
Bonaventura J, Bonaventura C (1980): Hemocyanins: Relationships in their structure, function and assembly. Amer. Zool. 20, 7-17.
Bragg PD, Hou C (1976): Cross-linking of minor subunits in Ca^{2+}, Mg^{2+} activated ATPase of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Res. Commun 72, 1042-1048
Bramhall S, Noack N, Wu M, Leowenburg JR (1969): A simple colorimetric method for determination of protein. Anal. Biochem. 31 146-148.
Brenner S, Horne RW (1959): A negativ staining method for high resolution electron microscopgy of viruses. Biochim. Biohphys. Acta 34, 103-110.
Brouwer M, Bonaventura C, Bonaventura J (1977): Oxygen binding by Limulus polyphemus hemocyanin: Allosteric modulation by chloride ions. Biochemistry 16, 3897-3902.
Brouwer M, Bonaventura C, Bonaventura J (1978): Analysis of the effeckt of three different allosteric ligands on oxygen binding by hemocyanin of the shrimp, Penaeus setiferus. Biochemistry 17,2148-2154.
Bruggen EFJ van, Fernáudez-Morán H (1966): Reassociation of hemocyanins from subunit mixtures. J. Mol. Biol. 16, 208-211.
Bruggen EFJ van, Bijlholt MMC, Schutter WG, Wichertjes T, Bonaventura J, Bonaventura C, Lamy J, Lamy J, Leclerc M, Schneider H-J, Markl J, Linzen B: The role of structurally diverse subunits in the assembly of three cheliceration hemocyanins. FEBS Letter 116, 207-210.
Brunori M, Kuiper HK, Antonius E, Bonaventura C, Bonaventura J (1981): Kinetics of oxygen binding by hemocyanins.(In: Lamy J (ed) Structure, active site, and function of invertebrate oxygen binding proteins. Dekker, New York, in press.
Buc H, Johannes K-J, Hess B (1973): Appendix to: Allosteric kinetics of pyruvate kinase of Saccharomyces carlsbergensis. (by Johannes K-J, Hess B). J Mol Biol. 76, 199-205.
Chan WWC, Enns CA (1979) : Aspartate transcarbamoylase: loss of homotropic but not heterotropic interactions upon modification of the catalytic subunits with a bifunctional reagent. Can. J. Biochem. 57, 798-805.
Chien JCJ, Mayo KH (1980): Carp hemoglobin. 1. Precise oxygen equilibrium and analysis according to the models of Adair and Monod, Wyman and Changeux. J. Biol. Chem. 255, 9790-9799.

Chervenka CH (1973): A manual of methods for the analytical ultracentrifuge. Spinco devision of Beckmann Instruments, Palo Alto, California 94304.

Clegg C, and Hayes D (1974): Identification of neighbouring proteins in the ribosomes of Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 42, 21-28.

Decker H, Markl J, Loewe R, Linzen B (1979): Hemocyanins in spider VIII: Oxygen affinity of the individual subunits isolated from Eurypelma californicum hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 360, 1505-1507.

Decker H, Schmid R, Markl J, Linzen B (1980): Hemocyanins in spiders XII: Dissociation and reassociation of Eurypelma hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 631 1707-1717.

Driel van R, Bruggen EFJ van (1975): Functional properties of chemically modified hemocyanin. Fixation of hemocyanin in the low and the high oxygen affinity state by reaction with an bifunctional imidoester. Biochemistry 14,730-735.

Edelstein SJ (1975): Cooperative interactions of hemoglobin Ann. Review of Biochem. 44, 209-232.

Edsall JT, Felsenfeld G, Goodman DS, Gurd FRN (1954): The asiation of imidazole with the ions of zinc and cupric copper. J. Amer. Chem. Soc. 76,3054-3058.

Elias H-G, (1969): Ultrazentrifugen-Methoden. Beckman Instruments GmbH, München.

Ellerton HD, Carpenter DE, Holde KE van : Physical studies of hemocyanins. V. Characterisation and subunit structure of the hemocyanin of Cancer magister. Biochemistry 9, 2225-2232.

Enns CA, Chan W W-C (1979): Conformational states of aspartate transcarbamoylase stabilized with cross-linking reagent. J. of Biol. Chem. 254, 6180-6186.

Er-El Z, Skaklai N, Daniel E (1972): Oxygen binding properties of hemocyanin from Levantina hierosolima. J. Mol. Biol. 64, 341-351.

Hajdu J, Bartha F, Friedrich P (1976): Crosslinking with bifunctional reagents as a means for studying the symmetry of oligomeric proteins. Eur. J. Biochem. 68, 373-383.

Hamlin LM and Fish WW (1977): The subunit characterization of Callinectes sapidus hemocyanin. Biochem. Biophys. Acta 191, 46-52.

Hedrick JL, Smith AJ (1968): Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164.

Holde KE van, Bruggen EFJ van (1971): The hemocyanins. In: Timasheff SN, Fasman GD (eds): Subunits in biological system. Dekker, New York, pp 1-53.

Hopfield JJ, Shulman RG, Ogawa (1971): An allosteric modell of hemoglobin. I. Kinetics. J. Mol. Biol. 61, 425-443.

Imai K (1973): Analysis of Oxygen equilibria of native and chemically modified human adult hemoglobins on the basis of Adair's stepwise oxygenation theory and the allosteric model of Monod, Wyman and Changeux. Biochemistry 12, 798-806.

Jeffrey PD, Shaw DC, Treacy GB (1976): Hemocyanin from the australian freshwater crayfish Cherax destructor. Studies of two different monomeres and their participation in the formation of multiple hexamers. Biochemistry 15, 5527-5533.

Jeffrey PD, Shaw DC, Treacy GB (1978): Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish Cherax destructor. Characterization of a dimeric subunit and its involvement in the formation of the 25 S component. Biochemistry 17, 3078-3084.

Jeffrey PD (1979): Hemocyanin from the Australian freshwater crayfish Cherax destructor. Electron microscopy of native and reassembled molecules. Biochemistry 12, 2508-2513.

Jeffrey PD, Andrews PR (1980): Application of calculated sedimentation ratios in the specification of models for protein dimers, trimers, tetramers and pentamers, Biophs. Chem. 11, 61-70.

Jeffrey PD, Treacy GB (1980): Hemocyanin from the australian freshwater crayfish Cherax destructor. Oxygen binding sites of mejor components. Biochemistry 19, 5428-5433.

Ji TH (1979): The application of chemical cross-linking for studies on cell membranes and the identification of surface reportes. Biochem. et Biophys. Acta 559, 39-69.

Klarman A, Gottlieb J, Daniel E, (1979): Quaternary structure and arrangement of subunits in hemocyanin from the scorpion Leirus quinquestriatus. Biochemistry 18, 2239-2244.

Klarmann A, Gottlieb J, Daniel E (1980): Oxygen binding properties of stripped (calcium ion and magnesium ion free) hemocyanin from scorpion Leirus quinquestriatus.

Kotz JM, Darnall DW, Langerman NR (1975): Quaternary structure of proteins. (In Neurath H. (ed.): The proteins. Academic Press, New York, San Francisco, London.

Koshland DE jr,Nemethy G and Filmer D (1966): Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochmistry 5, 356-387.

Kuiper HA, Gaastra W, Beintema JJ, Bruggen EFJ van, Schepman AMH, Drenth J. (1975): Subunit composition, X-ray diffraction, amino acid analysis and oxygen binding behaviour of Panulirus interruptus hemocyanin. J. Mol. Biol. 99, 619-629.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bcteriophage T 4. Nature (London) 227,680-685.

Lamy J, Lamy J, Daglin M-C, Weill J (1977): Scorpion hemocyanin subunits: properties, dissociation, association. In: Bannister JV (ed) Structure and function of haemocyanin. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 37-49.

Lamy J, Lamy J, Weill J (1979a):Arthropod hemocyanin structure. Isolation of eight subunits in the scorpion. Arch.Biochem. Biophys. 193,140-149.

Lamy J, Lamy J, Weill J, Bonaventura J, Bonaventrua C, Brenowitz M (1979b):Purification and immunological identification of the dissociation products of native Limulus polyphemus and Tachypleus tridentatus hemocyanins. Arch. Biochem. Biophy. 196,324-339.

Lamy J, Lamy J, Weill J, Markl J, Schneider H-J, Linzen B (1979c): Hemocyanins in spiders. VII.Immunological comparison of the subunits of Eurypelma californicum hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 889-895.

Lamy J, Lamy J, Sizaret P-Y, Weill J (1981a): Quaternary structure of Androctonus australis hemocyanin. In: Lamy J (ed) Structure, active site, and function of invertebrate oxygen binding proteins. Dekker, New York, Biochem.istrv

Lamy J, Bijholt MMC, Sizaret P-Y, Lamy J, van Bruggen EFJ (1981b): Quaternary Structure of scorpion (Androctonus australis) hemocyanin. Localization of subunits with immunological methods and electron microscopy. Biochemistry 20, 1849-1856.

Langerman NR, Klotz JM (1969): Free enery of subunit interaction. Hemerythrin.Biochemistry 8, 4746-4752.

Lehninger AL (1977): Biochemie. Verlag Chemie - Weinheim - New York.

Loehr JS, Mason HS, (1973): Dimorphism of Cancer magister hemocyanin subunits. Biochem. Biophys. Res. Comm. 51, 741-745.

Loewe, R (1972): Hämocyanin in der Hämolymphe zweier Spinnen, Dugesiella californica und Cupiennius salei Keyserling. Dissertation, München.

Loewe,R, Linzen B, (1973): Hemocyanins in spiders. I. Subunits and stability region of Dugesiella californica hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 182-188.

Loewe R, Linzen B, (1975): Hemocyanins in spider. II. Automatic recording of oxygen binding curves, and the effect of Mg^{2+} on oxygen affinity, cooperativity and subunit association of Cupiennius salei hemocyanin. J. Comp. Physiol. 98, 147-156.

Loewe R, Schmid R, Linzen B (1977): Subunit association and oxygen-binding properties in spider hemocyanins, In: Bannister JV (ed) Structure and function of hemocyanin. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 50-54.

Loewe R (1978): Hemocyanins in spiders. V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its aplication to the analysis of allosteric interactions in Eurypelma californicum hemocyanin. J. Comp. Physio. 128, 161-168.

Loewe R, Brauer de Eggert H(1979): Blood gas analysis and acid-base status in the hemolymph of a spider (Eurypelma californicum)- influence of temperature. J.Comp. Physiol. 134, 331-338.

Lomant AJ, Fairbanks G (1976): Chemical probes of extended biological structures synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent (^{35}S) Dithiobis (succimidyl-propionate). J. Mol. Biol. 104, 243-261.

Lontie R, Witters R (1973) Hemocyanin. In: Eichhorn GL (ed) Inorganic biochemistry, vol 1. Elsevier, Amsterdam pp 344-358.

Markl J, Markl A, Schartau W, Linzen B (1979a): Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins. I. Chelicerata J. Comp. Physiol. 130, 283-292.

Markl J, Hofer A, Bauer G, Markl A Kempter B, Brenzinger M, Linzen B (1979b) Subunit heterogeneity in arthropod

hemocyanins. II, Crustacea. J. Comp. Physiol. 133, 167-175.
Markl J, Strych W, Schartau W, Schneider H-J, Schöberl P, Linzen B (1979c): Hemocyanins in spiders. VI. Schöberl P, son of the polypeptide chains of Eurypelma californicum hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 639-650.
Markl J (1980): Hemocyanins in spiders. XI. The quaternary structure of Cupiennius hemocyanin. J. Comp. Physiol. 140, 199-207.
Markl J, Savel A, Decker H, Linzen B (1980): Hemocyanins in spiders. IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of Eurypelma californicum hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 361, 649-660.
Markl J, Decker H, Savel A, Linzen B (1981a): Homogeneity, subunit heterogeneity, and quaternary structure of Eurypelma hemocyanin. In: Lamy J (ed) Structure, active site, and function of invertebrate oxygen proteins. Dekker, New York, in Press.
Markl J, Decker H, Stöcker W, Savel A, Linzen B, Schutter G, Bruggen EFJ van, (1981b): On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 185-188.
Markl J, Bonaventura C, Bonaventura J (1981c): Hemocyanins in spiders, VIII. Kinetics of oxygen dissociation from individual subunits of Eurypelma and Cupiennius hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physio. Chem. 362, 429-437.
Markl J, Kempter B (1981): Subunit heterogeneity in crustacean hemocyanins as deduced by two-dimensional immunoelectrophoresis. J. comp. Physiol. 141, 495-502.
Maurer HR (1968): Disc-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co. Berlin.
Miller K, Holde KE van (1974): Oxygen binding by Callianassa californiensis hemocyanin. Biochemistry 13, 1668-1674.
Monod J, Wyman J, Changeux J-P (1965): On the nature of allosteric transition: A plausible model. J. Mol. Biol. 12, 88-118.
Morimoto Kegeles (1971): Subunit interactions of lobster hemocyanin. I. Ultracentrifuge studies. Arch. Biochem. and Biophys. 142, 247-257.
Murray AC, Jeffrey PD (1974): Hemocyanin from the Australian freshwater crayfisch, Cherax destructor. Subunit heterogeneity. Biochemistry 13, 3667-3671.
Perutz MF (1970): Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin.Nature 228, 726-734.
Pilz J, Goral K, Hoylaerts M, Witters R, Lontie R (1980): Studies by small-angle X-ray scattering of the quaternary structure of the 24 S-component of the hemocyanin of Astacus leptodactylus in solution. Eur. J. Biochem. 105, 539-543.
Redmond (1955): The respiratory function of hemocyanin in crustacea. J. cell. comp. Physiol 46, 209-247.
Robinson HA , Ellerton HD (1977): Heterogeneous subunits of the hemocyanins from Jasus edwardsii and Ovalipes catharus. In Strucure and function of haemocyanin. Bannister JV (ed).pp. 55-70. Berlin, Heidelberg,New York, Springer.
Rochu D, Fine JM (1978): Antigenic structure of the hemocyanin in six species of decapod crustacea. Comp. Biochem. Physiol. 59A, 145-150.

Roxby R, Miller K, Blair DP, Holde KE van (1974): Subunits and association equilibria of Callianassa californiensis hemocyanin. Biochemistry 13, 1662-1668.

Ruoho A, Bartlett PA, Dutton A, Singer SJ (1975): A disulphe-bridge bifunctional imidoester as a reversible cross-linking reagent. Biochem. Biophys. Res. Commun 63, 417-423.

Savel A, (1979): Zur Frage der Einheitlichkeit des 37 S-Hämocyanin aus der Vogelspinne Eurypelma californicum Zulassungsarbeit, Universität München.

Schaick EJM van, Schutter WG, Gaykema WPJ, Burgen EFJ van, Hol WGJ (1981): The crystal structure of the hemocyanin hexamer from Panulirus interruptus at 5 A resolution. In: Lamy J (ed) Structure, active site, and function of invertebrate oxygen binding proteins. Dekker, New Yoerk, in press.

Schepmann AMH (1975): X-ray diffraction and electron microscopy. Thesis, Rijksuniversiteit Groningen.

Schmid R (1976): Chemisch-physikalische Untersuchungen an Spinnenhämocyaninen und ihren Untereinheiten. Dissertation, München.

Schneider H-J, Markl J, Schartau W, Linzen B (1977): Hemocyanins in spiders. IV. Subunit heterogeneity of Eurypelma (Dugesiella) hemocyanin and separation of polypeptide chains. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1133-1141.

Schneider H (1978): Über die Heterogenität der Untereinheiten des Hämocyanins aus der Vogelspinne Eurypelma californicum. Dissertation, München.

Schramm HJ, Dülffer (1977): The use of 2-iminothiolane as a protein cross-linking reagent. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 137-139.

Schutter WG, Bruggen EFJ van, Bonaventura J, Bonaventura C, Sullivan B (1977): Structure, dissociation and reassembly of Limulus polyphemus hemocyanin. In: Bannister JV (ed) Structure and function of hemocyanin. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 13-21.

Sengbusch P von (1979): Molekular- und Zellbiologie. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.

Shaklai N, Klarmann A, Daniel E (1975): Oxygen bindung by hemocyanin from Levantina hierosolima. II Interpretation of cooperativity in terms of ligand-ligand linkage. Biochemistry 14, 105-108.

Siezen RJ, Bruggen EFJ van (1974): Structure and Properties of hemocyanins. XII. Electron microscopy of dissociation products of Helix pomatiahemocyanin: Quaternary structure. J Mol. Biol. 90, 77-89.

Strych W (1981) : Proteinchemischer Vergleich der Hämocyanin-untereinheiten aus den Spinnen Eurypelma californicum und Cupiennius salei. Dissertation, München 1981.

Sugita H, Sekiguchi K (1975): Heterogeneity of the minimum functional unit of hemocyanins from the spider (Argiope bruenichii), the scorpion (Heterometrus spec.), and the horseshoe crab (Tachyleus tredentatus) J. Biochem. (Tokyo) 78, 713-718.

Sullivan B, Bonaventura J, Bonaventura C (1974): Functional differences in the multiple hemocyanins of the horseshoe crab, Limulus polyphemus L. Pro. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2553-2562.

Sullivan B, Bonaventura J, Bonaventura C, Godette G (1976): Hemocyanin of the horseshoe crab, Limulus polyphemus, Structural differentiation of the isolated components. J Biol, Chem. 251, 7644-7648.

Sun T-T, Bollen A, Kahna L, Traut RR (1974): Topography of ribosomal proteins of the Escherichia coli 30 S subunits as studied with the reversible cross-linking reagent methyl-4-mercaptobutyrimidate. Biochemistry 13, 2334-2340

Truchot J-P (1980): Lactate increases in oxygen affinity of crab hemocyanin.J. exp. Zool. 214, 205-208.

Wajcman H, Mc Mahill D, Mason HS (1977): Automatic measurement of the oxygen affinity of Cancer magister hemocyanin. Comp. Biochem. Physiol. B57,139-142.

Wang K, and Richards FM (1974): An approach to nearest neighbor analysis of membrane proteins. J. Biol. Chem. 249, 8005-8014.

Weeke B (1973): Crosses immunoelectrophoresis. Scand J Immunol 2, 47-56.

Weber K, Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacralamide gel elektrophoresis. J Biol. Chem. 244, 44o(-4412.

Wibo M (1966) Recherches sur les nemocyannes des arthropodes: constantes de s´dimentation et aspects morphologiques Thesis, Université Catholique de Louvain.

Wyman J (1964): Linked funcktions and reciprocal effekts in haemoglobin. Quart. Rev. Biophys. 1, 35-80.

Zolla L, Kuiper HA, Vecchini P, Antonini E, Brunori M (1978): Dissociation and Oxygen-binding behaviour of ß-hemocyanin from Helix pomatia. Eur. J. Biochem. 87, 467-473.

G. ANHÄNGE

Im Folgenden werden Original-Protokollstreifen der Programme für die Flächenberechnung und Auswertung der Originalsauerstoffbindungskurven aufgeführt.

Benutzt wurde der Tischrechner Tektronix 31, an dem ein Digitalisierungstablett angeschlossen war.

1. Flächenberechnung

Es lag das Prinzip der Flächenintegration zu Grunde.

```
FLAECHENBERECH-
      NUNG

N*PUNKTE
           2

      .48 [illegible]
      .48 [illegible]

      . [illegible]
      .92 [illegible]
```

N = Anzahl der Punkte, mit der die Flächenbegrenzung abgegriffen wurde.

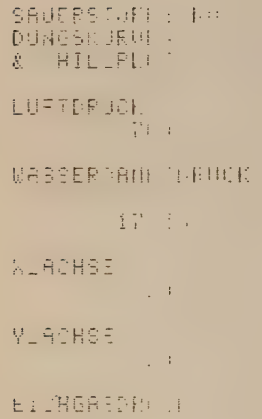
← Gesamtfläche in cm^2

0000	:	0035		0070	R__	0105	9
0001	:	0036	CLM	0071	0	0106	LBL
0002	:	0037	STOH	0072	0	0107	DGM
0003	:	0038	=	0073	0	0108	R__
0004	:	0039	R__	0074	-	0109	R__
0005	:	0040	8	0075	R__	0110	0
0006	:	0041	0	0076	0	0111	9
0007	:	0042	PRN	0077	0	0112	9
0008	:	0043	CLR	0078	0	0113	INT
0009	:	0044	=	0079	INT	0114	-
0010	:	0045	R__	0080	=	0115	R__
0011	:	0046	8	0081	R__	0116	8
0012	:	0047	9	0082	8	0117	5
0013	:	0048	PAR	0083	6	0118	=
0014	.	0049	CLR	0084	+	0119	/
0015		0050	ADR	0085	1	0120	.
0016		0051	R__	0086	0	0121	0
0017		0052	0	0087	0	0122	0
0018		0053	0	0088	=	0123	=
0019		0054	6	0089	R__	0124	R__
0020		0055	R__	0090	8	0125	9
0021	:	0056	8	0091	7	0126	0
0022	:	0057	0	0092	CLM	0127	R__
0023	:	0058	RN__	0093	=	0128	R__
0024	:	0059	8	0094	R__	0129	0
0025	PRM	0060	8	0095	0	0130	9
0026	PRM	0061	R__	0096	9	0131	9
0027	:	0062	0	0097	[illegible]	0132	-
0028	.	0063	6	0098	1	0133	R__
0029	:	0064	6	0099	0	0134	F__
0030	:	0065	INT	0100	0	0135	0
0031	:	0066	=	0101	-	0136	.
0032	:	0067	R__	0102	R__	0137	:
0033	.	0068	.	0103		0138	[illegible]
0034	:	0069	=	0104	9	0139	/

```
0140  -
0141  R__
0142  8
0143  6
0144  =
0145  +/-
0146  =
0147  *
0148  1
0149  0
0150  0
0151  =
0152  R__
0153  9
0154  1
0155  R___
0156  0
0157  9
0158  9
0159  +
0160  1
0161  =
0162  R___
0163  0
0164  9
0165  9
0166  R___
0167  R___
0168  0
0169  9
0170  9
0171  IN
0172  -
0173  R__
0174  8
0175  5
0176  =
0177  -/
0178  1
0179  0
0180  0
0181  =
0182  R__
0183  9
0184  2
0185  R___
0186  R___
0187  0
0188  9
0189  9
0190  -
0191  R___
0192  R__
0193  0
0194  9
0195  9
0196  INT
0197  =
0198  -
0199  R__
0200  8
0201  6
0202  =
0203  +/-
0204  =
0205  *
0206  1
0207  0
0208  0
0209  =
0210  R__
0211  9
0212  3
0213  R__
0214  9
0215  2
0216  -
0217  R__
0218  9
0219  0
0220  )
0221  *
0222  (
0223  R__
0224  9
0225  3
0226  +
0227  R__
0228  9
0229  1
0230  )
0231  -
0232  0
0233
0234  5
0235  =
0236  R__
0237  9
0238  4
0239  PRN
0240  +
0241  R__
0242  8
0243  9
0244  =
0245  R__
0246  8
0247  9
0248  PRN
0249  R___
0250  0
0251  9
0252  9
0253  -
0254  R__
0255  8
0256  0
0257  )
0258  IF=0
0259  STOP
0260  CONT
0261  PAPT
0262  EXC.
0263  DG/T
```

2. Auswertung der Sauerstoffbindunskurven

Ausdruck



N = Anzahl der Punkte, mit der die Kurve abgegriffen wird

geräteinternes (x/y) Paar

x-Koordinate, bezogen auf den Nullpunkt der Sauerstoffbindungskurve

korrigierter pO_2-Wert

y-Koordinate, bezogen auf den Nullpunkt der Sauerstoffbindungskurve

korrigierter $\log \frac{y}{1-y}$ -Wert

$Q = \log \frac{y}{1-y} - \log pO_2$

korrigierter pO_2-Wert

α -Wert $= pO_2 / p_{diss,R}$

ν = Oxygenierungszustand, d.h. mittlere Anzahl der beladenen Untereinheiten

```
0064  PRN
0065  PAPI
0066
0067
0068
0069
0070
0071
0072
0073
0074
0075
0076
0077
0078
0079
0080
0081
0082  PAPI
0083  CLDI
0084  STOI
0085  =
0086  K_
0087  1
0088  PRN
0089  PAPI
0090
0091
0092
0093
0094
0095
0096
0097  PAPI
0098  CLDI
0099  STOI
0100  =
0101  K_
0102  2
0103  PRN
0104  PAPI
0105
0106
0107
0108
0109
0110
0111
0112  PAPI
0113  CLDI
0114  STOI
0115  -
0116  K_
0117  3
0119  PRN
0119  1/X
0120  =
0121  K_
0122  3
0123  PAPI
0124
0125
0126
0127

0128
0129
0130
0131
0132
0133
0134
0135
0136
0137
0138
0139
0140  PAPI
0141  CLDI
0142  STOI
0143  =
0144  K_
0145  4
0146  PRN
0147  PAPI
0148
0149
0150
0151
0152
0153
0154
0155
0156
0157
0158
0159
0160
0161  PAPI
0162  CLDI
0163  STOI
0164  =
0165  R_..
0166  8
0167  0
0168  PRN
0169  PAPI
0170  CLDI
0171  STOI
0172  PAPI
0173  EXC.
0174  0
0175  LBL.
0176  0
0177  CLR
0178  RDR
0179  R_..
0180  0
0181  0
0182  0
0183  R_..
0184  8
0185  0
0186  RM.
0187  8
0188  8
0189  R_.
0190  0
0191  0

0192  0
0193  IN
0194  =
0195  R_..
0196  8
0197  5
0198  R_..
0199  0
0200  0
0201  0
0202  -
0203  R_..
0204  0
0205  0
0206  0
0207  IN
0208  =
0209  R_..
0210  8
0211  6
0212  CLDI
0213  =
0214  R_..
0215  0
0216  9
0217  9
0218  1
0219  0
0220  0
0221  =
0222  R_..
0223  1
0224  9
0225  9
0226  LBL.
0227  1
0228  K_
0229  0
0230  -
0231  K_
0232  1
0233  )
0234  =
0235  K_
0236  7
0237  *
0238  K_
0239  4
0240  =
0241  R_..
0242  8
0243  7
0244  .
0245  1
0246  0
0247  0
0248  =
0249  R_..
0250  8
0251  8
0252  .
0253  1
0254  2
0255  =
```

```
0256  K_
0257  "
0258  P__
0259  R__
0260  6
0261  9
0262  9
0263  PRN"
0264  .N"
0265  -
0266  R__
0267  8
0268  5
0269  =
0270  /
0271  1
0272  6
0273  0
0274  =
0275  PRN"
0276  *
0277  K_
0278  7
0279  =
0280  IF=1
0281  =
0282  K_
0283  8
0284  PRN"
0285  GO"1
0286  H
0287  2
0288  9
0289  3
0290  CON"
0291  LOG
0292  =
0293  K_
0294  8
0295  PRN"
0296  R__
0297  P__
0298  0
0299  9
0300  9
0301  -
0302  K__
0303  I__
0304  0
0305  *
0306  9
0307  .N"
0308  =
0309  +/-
0310  =
0311  -
0312  P__
0313  8
0314  4
0315  =
0316  *
0317
```

```
0320  =
0321  PRN
0322
0323  K_
0324  3
0325  *
0326  1
0327  0
0328  0
0329  =
0330  K_
0331  6
0332  =
0333  +/-
0334  =
0335  *
0336  1
0337  0
0338  0
0339  =
0340  1/X
0341  =
0342  *
0343  K_
0344  6
0345  =
0346  IF=1
0347  =
0348  K_
0349  9
0350  PRN
0351  GO"1
0352  0
0353  3
0354  6
0355  0
0356  CON"
0357  LOG
0358  =
0359  K_
0360  9
0361  PRN"
0362  -
0363  K_
0364  6
0365  =
0366  K_
0367  *
0368  PRN"
0369  K_
0370  8
0371  *
0372  2
0373
0374  3
0375  6
0376  3
0377  =
0378  E
0379  -
0380  K_
0381  P
0382  P
0383
```

```
0384  6
0385  Prb
0386  *
0387  2
0388  4
0389  =
0390  K_
0391  6
0392  PRN
0393  R___
0394  0
0395  9
0396  9
0397  +
0398  1
0399  =
0400  R___
0401  0
0402  9
0403  9
0404  R___
0405  1
0406  9
0407  9
0408  *
0409  1
0410  =
0411  R__
0412  1
0413  9
0414  9
0415  K__
0416  0
0417  9
0418  9
0419  -
0420  P__
0421  8
0422  H
0423  *
0424  IF=1
0425  GTO
0426  CON"
0427  PAPI
0428  EXC
0429  1
0430  NULL
0431  NULL
0432  NULL
0433  NULL
0434  NULL
0435  NULL
0436  NULL
0437  NULL
0438  NULL
0439  NULL
0440  NULL
0441  NULL
0442  NULL
0443  NULL
0444  NULL
0445  NULL
0446  NUL
0447  NUL
```

LEBENSLAUF

Ich, Heinz Anton Decker, wurde am 27. November 1950 als Sohn des Oberamtmanns Erich Decker und seiner Ehefrau Anna, geb. Janisch, in Regensburg geboren.
Von 1957 - 1962 besuchte ich die Volksschule in Fürstenfeldbruck, ab 1959 die Volksschule an der Herrenstraße in München, anschließend das Gymnasium an der Eduard-Schmidstraße in München.
1963 wechselte ich an das Graf-Rasso-Gymnasium in Fürstenfeldbruck. Dort legte ich im Juli 1971 das Abitur ab.
Im Wintersemester 1971 begann ich mit dem Studium der Biologie und Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München.
Im Herbst 1973 legte ich das Vordiplom in Physik, im Herbst 1976 das Staatsexamen im Biologie und Physik ab.
Im Februar 1977 begann ich mit der vorliegenden Promotionsarbeit.